AKTIVIERUNG UND REDUKTION AROMATISCHER SÄUREN IM ZELLFREIEN SYSTEM

GEORG GÜNTER GROSS

MÜNCHEN

1968

Aktivierung und Reduktion aromatischer Säuren im zellfreien System

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Georg Günter Groß
aus
München

1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof.Dr.M.H.Zenk
2. Berichterstatter: Prof.Dr.L.Brauner

Tag der mündlichen Prüfung: 26.6.1968.

Fotodruck: Mikrokopie GmbH, 8 München 22, Bruderstraße 9

Inhaltsverzeichnis

Seite:

I. EINLEITUNG 1

I. MATERIAL und METHODEN 5

1. Herkunft und Anzucht der Pilzkulturen 5
2. Enzyme, Coenzyme, Chemikalien und Isotopen .. 7
3. Photometrische Bestimmungen 9
4. Messung der Radioaktivität 1o
5. Nachweis aktivierter Zimtsäureester durch den Hydroxamsäuretest 1o
6. Darstellung von Zimthydroxamsäuren 11
7. Darstellung von Zimtsäure-CoA-Thiolestern ... 11
8. Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten der Zimtsäure-CoA-Thiolester 13
9. Bestimmung der Hydrolysenkonstanten von Zimtsäure-CoA-Thiolestern 14
1o. Konjugierung von Zimtsäuren mit Glycin 14
11. Disc-Elektrophorese in Polyacrylamidgel 15

I. ERGEBNISSE 15

A. Darstellung und Eigenschaften von Coenzym A-Estern aromatischer Säuren 15

1. Nachweis der Aktivierung von Zimtsäuren durch Acyl-CoA-Ligase 17
2. Präparative Darstellung einiger Coenzym A-Thiolester 18
3. Optischer Test zum Nachweis der Aktivierung.. 22
4. Konjugation von Zimtsäuren mit Glycin 26

Seite:

B. Reduktion aromatischer Säuren in vivo 28

1. Bildung von Salicylalkohol aus Salicylsäure durch Mycelien von Neurospora crassa 28
2. Untersuchungen an anderen Organismen 31

C. Untersuchungen zur Induktion aromatische Säuren- bzw. Aldehyde-reduzierender Enzymsysteme 32

1. Methoden zur Aktivitätsbestimmung von Aryl-Aldehyd- und von Aryl-Alkohol-Oxidoreduktase 32

1.1 Definition der Einheit der enzymatischen Aktivität 32

1.2 Aktivitätsbestimmung der Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase 32

1.2.1 Aktivitätsbestimmung der Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase aus Neurospora crassa.. 33

1.2.2 Weitere Methoden zur Aktivitätsbestimmung 35

1.3 Bestimmung der Aryl-Alkohol-Oxidoreduktase aus Neurospora crassa 36

2. Nachweis reduzierender Enzyme im Rohextrakt 37

2.1 Reduktion von Veratrumsäure durch zellfreie Extrakte aus Polystictus (Trametes) versicolor 37

2.2 Nachweis der Reduktion von Salicylsäure durch Rohextrakte aus Neurospora crassa 39

3. Bestimmung von Aryl-Aldehyd- und Aryl-Alkohol-Oxidoreduktase aus Neurospora crassa und Polystictus (Trametes) versicolor 41

D. Reinigung und Eigenschaften von Aryl-Aldehyd: NADP-Oxidoreduktase aus Neurospora crassa 43

1. Reinigung des Enzyms 43

Seite:

1.1 Aufschluß der Mycelien 43
1.2 Fällung mit Protaminsulfat 44
1.3 Fraktionierung mit Ammoniumsulfat 45
1.4 Adsorption an $CaPO_4$-Gel 46
1.5 Erste Chromatographie an DEAE-Cellulose 47
1.6 Chromatographie an Hydroxylapatit 49
1.7 Zweite Chromatographie an DEAE-Cellulos 51
1.8 Reinheit, Molekulargewicht und Stabilität des Enzympräparates 53

2. Eigenschaften der Aryl-Aldehyd:NADP-Oxidoreduktase 55

2.1 Bestimmung der an der Reaktion beteiligten Coenzyme und Cofaktoren 55
2.2 Kinetik der Reaktion 58
2.3 Abhängigkeit der Reaktion von der Enzymkonzentration 59
2.4 pH-Abhängigkeit der Reaktion 59
2.5 Abhängigkeit der Reaktonsgeschwindigkeit von den Substratkonzentrationen... 61
2.6 Temperaturabhängigkeit der Reaktion ... 64
2.7 Substratspezifität der Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase 65
2.8 Stöchiometrie der Reaktion 67

E. Reinigung und Eigenschaften von Aryl-Alkohol: NADP-Oxidoreduktase aus Neurospora crassa 71

1. Reinigung des Enzyms 71

1.1 Aufschluß der Mycelien und Fällung mit Protaminsulfat 71
1.2 Fraktionierung mit Ammoniumsulfat 72
1.3 Adsorption an $CaPO_4$-Gel 73
1.4 Gelfiltration an Sephadex G 200 75
1.5 Chromatographie an DEAE-Cellulose 76
1.6 Reinheit, Molekulargewicht und Stabilität des Enzyms 77

2. Eigenschaften der Aryl-Alkohol:NADP-Oxidoreduktase 79

Seite:

2.1 Bestimmung der an der Reaktion beteiligten Coenzyme und Cofaktoren 79
2.2 Kinetik und Enzymabhängigkeit der Reaktion 8o
2.3 pH-Abhängigkeit des Enzyms 81
2.4 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration ... 81
2.5 Temperaturabhängigkeit der Aryl-Alkohol-Oxidoreduktase 85
2.6 Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten 86
2.7 Hemmung der Aryl-Alkohol-Oxidoreduktase 87
2.8 Substratspezifität der Aryl-Alkohol-Oxidoreduktase 88

F. Reduktion aromatischer Säuren durch zellfreie Extrakte aus Polystictus (Trametes) versicolor 91

1. Gewinnung zellfreier Extrakte aus Mycelien 91

2. Eigenschaften des aromatische Säuren reduzierenden Enzymsystems 91

IV. DISKUSSION 94

V. ZUSAMMENFASSUNG 99

VI. LITERATURBERZEICHNIS 1o2

Verzeichnis der im Text nicht näher erläuterten Abkürzungen :

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AE	Aminoäthyl-
AEDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
C	Cellulose
CM	Carboxymethyl-
CoA, CoA-SH	Coenzym A
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
DEAE	Diäthylaminoäthyl-
EC	Enzymverzeichnis (enzymes catalogue) der International Union of Biochemistry
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
ipm	Impulse pro Minute
ITP	Inosin-5'-triphosphat
NAD	Nicotinamin-adenin-dinucleotid
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, reduz.
POPOP	1.4-Bis-[2-(5-Phenyloxazolyl)]-Benzol
PPO	2.5-Diphenyloxazol
TEAE	Triäthylaminoäthyl-
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UTP	Uridin-5'-triphosphat

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545802_0023

I. EINLEITUNG

Unter den aromatischen Pflanzenstoffen steht das Lignin mengenmäßig und seiner Verbreitung nach ohne Zweifel an erster Stelle. Im Verein mit Cellulose bildet es die Hauptmasse verholzter Pflanzenteile. Die offensichtliche Bedeutung dieses wichtigen Naturstoffes wurde schon früh erkannt. Trotz der daraus resultierenden, nun schon mehr als ein Jahrhundert zurückreichenden Forschungen auf diesem Gebiet besitzen wir jedoch auch heute noch keine vollständige Kenntnis über seine Struktur und Biogenese. Immerhin vermittelten die vielfältigen Untersuchungen ein zumindest in den Grundzügen als gesichert zu betrachtendes Bild von der Entstehung und dem Aufbau des Lignins.

Chemisch gesehen, ist das Lignin ein komplexes Makromolekül, das - wie heute allgemein als erwiesen gilt - durch Polymerisation verschiedener Phenylallylalkohole entsteht. Sein Molekulargewicht wird im Falle des am besten untersuchten Coniferenlignins mit ca. 11 ooo angegeben (SCHUBERT, 1965). Als wichtigste phenylpropanoide Einheit des Ligninmoleküls ist Coniferylalkohol zu nennen; hinzu kommen kleinere Mengen an p-Cumarylalkohol und bei Angiospermen auch an Sinapylalkohol. Die schlüssigsten Hinweise, daß wirklich p-hydroxylierte Zimtalkohole die Ligninvorstufen sind, stammen aus dem Arbeitskreis um FREUDENBERG. Dieser hatte natürliches, nach BJÖRKMAN (1954) isoliertes Lignin mit synthetischem Material, das auf chemischem oder enzymatischem Wege durch Dehydrogenierung der oben genannten Alkohole hergestellt worden war, in allen Einzelheiten verglichen und weitgehende Übereinstimmung gefunden (FREUDENBERG et. al., 1962; FREUDENBERG, 1963). Weiterhin wurde es sehr wahrscheinlich gemacht, daß die Vernetzung der Zimtalkohole zum Ligninpolymeren durch die Wirkung einer Peroxidase ausgelöst wird. Die enzymatische Dehydrogenierung der p-ständigen Hydroxylgruppe führt zur Bildung mesomeriestabilisierter Radikale, die zunächst dimerisieren und nach erneutem Wasser-

stoffentzug zu größeren Molekülen zusammentreten. Zwei diese Reaktion katalysierende Peroxidasen konnten vor kurzem aus Bambussprossen isoliert und gereinigt werden (NAKAMURA und NOZU, 1967). Neben diesem Radikalmechanismus scheint die Ligninbildung auch unter Polymerisation oder durch Addition an die Doppelbindung der Seitenkette der Zimtalkohole vor sich zu gehen (FREUDENBERG 1962, 1963, 1964; BROWN, 1966).

HIGUCHI hatte 1962 gezeigt, daß radioaktiv markierte p-Cumarsäure oder Ferulasäure gut in Lignin eingebaut werden. Der Biosyntheseweg dieser Ligninvorstufen konnte in den letzten Jahren weitgehend geklärt werden. Erster Schritt ist die unter der Katalyse von Phenylalanin-Ammonium-Lyase (EC 4.3.1.5) durch NH_3-Abspaltung aus Phenylalanin erfolgende Bildung von Zimtsäure (KOUKOL und CONN, 1961). Diese wird durch stufenweise Hydroxylierung und Methoxylierung in diejenigen Säuren umgewandelt, deren Substitutionsmuster dem der ligninbildenden Alkohole entspricht (McCALLA und NEISH, 1959; NEISH, 1960). Bei Gramineen kann daneben p-Cumarsäure auch direkt durch Desaminierung von Tyrosin durch das Enzym Tyrosin-Ammonium-Lyase gebildet werden (NEISH, 1961).

Im weiteren Verlauf der Ligninbiosynthese müssen diese hydroxylierten oder methoxylierten Phenylacrylsäuren zu den entsprechenden Alkoholen reduziert werden. HIGUCHI und BROWN (1963) konnten nach Applizierung von Ferulasäure-(α-^{14}C) an Weizenpflanzen das Auftreten von Coniferylalkohol nachweisen. Daneben wurde auch radioaktiver Coniferylaldehyd gefunden; seine spezifische Aktivität war wesentlich höher als die des Alkohols. Dies läßt auf die stufenweise Reduktion der Carboxylgruppe durch die Katalyse zweier verschiedener Enzyme schließen, was auch chemisch am wahrscheinlichsten erscheint.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, ein Enzymsystem zu finden, das zur Reduktion aromatischer Säuren befähigt ist. Höhere Pflanzen enthalten im allgemeinen große Mengen organischer Säuren und phenolischer Verbindungen, die beim Aufschluß des Materials leicht zur Inaktivierung empfindlicher Enzyme führen. Da gleichzeitig in den Rohextrakten stets nur geringe Proteinkonzentrationen erhalten werden, versprachen Versuche an höheren Pflanzen wenig Erfolg. Aus diesen Gründen sollten Organismen aus der für enzymatische Arbeiten günstigeren Abteilung der Pilze auf ihr Vermögen, aromatische Säuren zu reduzieren, untersucht werden.

In der Abteilung der Fungi sind schon seit längerem einige Arten bekannt, die zur Reduktion der Carboxylgruppe aromatischer Säuren befähigt sind. FARMER et al. (1959) fanden, daß der Basidiomycet Polystictus (Trametes) versicolor in der Lage ist, methoxylierte Benzoesäuren zu Aldehyden und in geringerem Maße auch zu Alkoholen zu reduzieren. Dieses Reduktionsvermögen wurde später noch bei 12 weiteren Basidiomyceten entdeckt (HURST et al., 1962), jedoch schlugen bisher Versuche fehl, die Reduktion in einem zellfreien System nachzuweisen (HURST, 1963). Diese Fähigkeit zur Reduktion ist nicht auf Basidiomyceten allein beschränkt. Bei Ascomyceten wurde die Bildung von Salicylalkohol aus Salicylsäure durch Neurospora crassa nachgewiesen (BACHMANN et al., 1960). RAMAN und SHANMUGASUNDARAM beschrieben 1962 die Reduktion von Benzoesäure, sowie von p- und o-Aminobenzoesäure durch Aspergillus niger. Ergänzend sei bemerkt, daß auch ein Bakterium (Mycobacterium smegmatis) p-Aminobenzoesäure zum Alkohol zu reduzieren vermag (SLOANE et al., 1963).

Über eine Reduktion aromatischer Säuren im zellfreien System ist bisher nichts bekannt. Auch für die Reduktion aliphatischer Säuren gibt es nur wenige Beispiele. Grundsätzlich ist dabei zu sagen, daß die Reduktion einer Carboxylgruppe einen stark endergonischen Vorgang darstellt; die Änderung der freien

Energie $\Delta G'$ beträgt ungefähr 7 kcal/Mol. Die Reaktion muß daher über ein energiereiches, aktiviertes Intermediärprodukt verlaufen. Soweit bis jetzt bekannt ist, bestehen hierfür zwei Möglichkeiten: entweder die Bildung eines CoA-Thiolesters oder eines Acyl-Phosphats. Ersteres ist bei der Reduktion von Acetyl-CoA zu Acetaldehyd (BURTON und STADTMAN, 1953) sowie von Oxalyl-CoA zu Glyoxalat (QUAYLE, 1966) und bei der Bildung von Mevalonsäure aus ß-Hydroxy-ß-Methyl-Glutaryl-CoA (BUCHER et al., 1960; LINN, 1967) der Fall. Die zweite Möglichkeit ist bekannt aus der Reduktion von ß-Aspartylphosphat zu Asparaginsäure-ß-Semialdehyd (BLACK und WRIGHT, 1955; SURDIN, 1967) und vor allem durch die verschiedenen, in vielen Organismen nachgewiesenen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenasen. Diese Enzyme katalysieren in NAD- oder NADP-abhängiger Gleichgewichtsreaktion die Reduktion von 1.3-Diphospho-Glycerat zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat (CAPUTTO und DIXON, 1945; CORI et al., 1948; BRENNERMANN und VOLK, 1959; HOOD und CARR, 1967).

Daneben ist aber auch die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, daß das aktivierte Intermediärprodukt nicht freigesetzt wird. So bleiben etwa nach dem von LYNEN und TADA (1961) vorgeschlagenen Mechanismus für die Fettsäuresynthese die Zwischenprodukte über eine SH-Gruppe an das Enzymprotein gebunden; faßbar ist erst das Endprodukt. Dieser Reaktionsfolge geht jedoch in jedem Falle die Aktivierung der beteiligten Carboxylgruppen durch Coenzym A voran.

Die Tatsache, daß die Aktivierung einen so wesentlichen Schritt bei der Reduktion der Carboxylgruppe darstellt, legte es nahe, auf Darstellung und Eigenschaften energiereicher Ester aromatischer Säuren näher einzugehen. Insbesondere wird das intermediäre Auftreten von Coenzym A-Estern von Zimt- und Benzoesäuren bei der Biosynthese verschiedenster Naturstoffe postuliert, so vor allem bei der Reduktion substituierter Zimtsäuren zu den entsprechenden Alkoholen im Verlauf der Ligninbildung (NEISH, 1964; El-BASYOUNI und

NEISH, 1966; HIGUCHI und BROWN, 1963; ZENK, 1966), sowie bei der Biogenese flavonoider Verbindungen (BIRCH und DONOVAN, 1953; GRISEBACH, 1965). Es war deshalb eines der Ziele der vorliegenden Arbeit, diese energiereichen Verbindungen darzustellen und zu charakterisieren.

Die oben aufgeführten Enzyme katalysieren - mit Ausnahme von Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktase - die Reduktion aktivierter Säuren zu den entsprechenden Aldehyden. Die weitere Hydrogenierung der entstehenden Carbonylgruppe führt zur Bildung von Alkoholen. Über Alkohol-Oxidoreduktasen, durch welche die Reduktion aliphytischer Alkohole katalysiert wird, ist bereits eine Vielzahl von Arbeiten erschienen. Über entsprechende aromatische Aldehyde umsetzende Enzyme besitzen wir jedoch nur geringe Kenntnisse. Meist wurden nur Rohextrakte untersucht, wie etwa Enzympräparationen aus Hefe oder Polystictus versicolor (vgl. HURST, 1963). Genauer charakterisiert wurde eine Benzylalkohol-Dehydrogenase aus einer Pseudomonasart (KATAGIRI et al., 1967). Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb auch die enzymatische Reduktion aromatischer Aldehyde näher untersucht und - wenn möglich - ein derartige Reaktionen katalysierendes Enzymsystem angereichert und charakterisiert werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Herkunft und Anzucht der Pilzkulturen

Im Rahmen der Arbeit wurden Versuche mit folgenden Organismen aus der Abteilung der Fungi durchgeführt :

Aspergillus niger (Stamm Wisc. 72-4/11414) wurde auf Biomalz-Agar in Schrägröhrchen angezogen. Für Versuche wurden Konidien auf eine Nährlösung nach BENTLEY (1957) in sterilen Fernbachkolben (Vol. 450 ml) überimpft. Nach 3-5 Tagen bei

32° hatte sich auf dem Kulturmedium eine feste Mycelmatte gebildet, unter die streng aseptisch die sterile Substratlösung in einer Endkonzentration von $1o^{-2}$ - $2.1o^{-2}$ Mol/ltr. einpipettiert wurde. Nach siebentägiger Inkubation wurde die Lösung analysiert.

Ein Stamm von Polystictus (Trametes) versicolor wurde uns freundlicherweise von Frau Dr. M.E.K. WILLOSE-HENDERSON, Aberdeen zur Verfügung gestellt, wofür wir an dieser Stelle herzlich danken. Die Anzucht erfolgte auf einem sterilen Kartoffel-Saccharose-Medium (Kochsaft von 3oo g Kartoffeln plus 2o g Rohrzucker pro 1ooo ml Flüssigkeit; modifiziert nach WEISS, 1957) in flachen, mit Aluminiumfolie abgedeckten Wannen. Die Nährlösung wurde mit 3-4 von Agarplatten (15 g Agar in dem oben angeführten Medium) gewonnenen Inokula des Pilzes beimpft. Nach 8-1o Tagen bei 27° im Brutschrank wurde das Kulturmedium unter der herangewachsenen Mycelmatte abgesaugt, dreimal mit sterilem destilliertem Wasser nachgewaschen und 5oo ml einer sterilen $1o^{-2}$-m. Substratlösung (pH 6,5) unter das Mycel gegeben. Nach 4 Tagen Inkubation konnte das Medium untersucht werden. Zur Gewinnung zellfreier Extrakte wurden die Mycelmatten nach Abgießen des Kulturmediums mit Leitungsassser, Aqua dest. und schließlich $1o^{-2}$-m. Trispuffer, pH 7,6, gewaschen, bei -15° eingefroren und aufbewahrt.

Neurospora crassa (Wildtyp, Stamm SY7A, Fungal Genetic Stock Center Nr. 622) wurde auf einem das Konidienwachstum fördernden Agarmedium ("Malz-Pepton-Hefe-Medium" nach FROST, 1962) angezogen. Mycelien des Pilzes wurden in sog. "Penicillinschalen" mit je 1 ltr. FRIESschem Salzmedium (BEADLE und TATUM, 1945) unter Zusatz von 1o g Saccharose und 2 g Difco-Hefeextrakt (modifiziert nach BRADFORD und GIBGOT, 1963) angezogen; die Induktion der Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase erfolgte durch Zugabe von $1o^{-2}$ Mol/ltr. Salicylsäure in das Kulturmedium. Zum Beimpfen wurden die Pilzsporen vom konidienvermehrenden Medium mit einer Lösung von 2 %igem

Tween 20 abgeschwemmt und die erhaltene Konidiensuspension in das sterile Kulturmedium einpipettiert. Nach zwei-einhalbtägigem Wachstum des Pilzes in den bei Raumtemperatur (21°) geschüttelten Kolben wurden die Mycelien durch Filtrieren des Kulturmediums durch Verbandsstoff isoliert, anschließend zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und in Form flacher Fladen bei -15° eingefroren. Bei dieser Temperatur konnte das Material ohne größere Verluste an enzymatischer Aktivität 1-2 Monate lang aufbewahrt werden.

Für Versuche mit Saccharomyces cerevisiae wurde normale Preßhefe verwendet. Als Kulturmedium diente sowohl bei aeroben, als auch bei anaeroben Bedingungen 10 %ige Rohrzuckerlösung unter Zusatz von Zimtsäure oder Benzoesäure in 10^{-3}-m. Konzentration.

2. Enzyme, Coenzyme, Chemikalien und Isotopen

Von Fa. Boehringer, Mannheim, wurden bezogen: Alkohol-Dehydrogenase (1.1.1.1), Fumarase (4.2.1.2), Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (1.1.1.49), Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (NAD) (1.1.1. 12), Isocitrat-Dehydrogenase (NADP) (1.1.1.42), Katalase (1.11.1.6), Lactat-Dehydrogenase (1.1.1.27), Myokinase (2.7.4.3), 3-Phospho-Glycerat-Kinase (2.7.2.3), Phosphotransacetylase (2.3.1.8) und Pyruvat-Kinase (2.7.1.40). Anorganische Pyrophosphatase (3.6.1.6) stammte von Worthington.

Acyl-CoA-Ligase (6.2.1.2) wurde nach MAHLER et. al. (1953) dargestellt. Die Anreicherung wurde nach der Refraktionierung mit Ammoniumsulfat abgebrochen, da sich die anschließende Gelfällung mit $Al(OH)_3$ nur schlecht reproduzieren ließ. Das Präparat war frei von Acyl-CoA-Thiolase. Als Aktivitätstest bedienten wir uns der optisch verfolgbaren Aktivierung von Sorbinsäure nach MICHAL und BERGMEYER (1962); die für die Versuche verwendete Proteinlösung besaß eine spezifische Akti-

vität von 17 mE/mg Protein bei pH 7,6 und einer CoA-Konzentration von 15 mµMol/ml Ansatz.

Acyl-CoA:Glycin-N-Acyltransferase (2.3.1.13) wurde aus Rinderlebermitochondrien gewonnen. Der Rohextrakt wurde so mit Ammoniumsulfat gefällt (21-35 g/100 ml), daß die erhaltene Proteinfraktion neben diesem Enzym auch Acyl-CoA-Ligase enthielt (vgl. SCHACHTER und TAGGART, 1954).

An Coenzymen wurden verwendet: AMP von Sigma; CTP, GTP und ITP von Pabst Laboratories; UTP von Fluka AG; von Boehringer stammten ATP, ADP, CoA, NAD, NADH, NADP, NADPH, 3-Phospho-Glycerat (Na-Salz), Glucose-6-Phosphat, Phosphoenolpyruvat (K-Salz) und Cytochrom c.

Alle käuflich erworbenen Chemikalien waren von größtmöglicher Reinheit; wenn nötig, wurden die Substanzen durch Umkristallisieren oder Destillation gereinigt.

Zur Reinigung von Enzymen wurden verwendet: Protaminsulfat von E. Lilly, Indianapolis; Sephadex G 200 und G 25, sowie DEAE-Sephadex A 50 von Pharmacia; CM-, AE-, DEAE- und TEAE-Cellulose von Serva Entwicklungslabor, Heidelberg; Hydroxylapatit von Bio-Rad Laboratories.

Dithiothreitol (Cleland-Reagens) stammte von Calbiochem, Serumalbumin von den Behringwerken (Marburg) und Tris(hydroxymethyl)aminomethan vom Serva Entwicklungslabor.

Veratrylaldehyd wurde dargestellt durch Methylierung von Vanillin nach BUCK (1959). Veratrylalkohol und 3.4.5-Trimethoxybenzylalkohol wurden in Anlehnung an das Verfahren von SNYDER und PILGRIM (1948) durch Reduktion der entsprechenden Aldehyde mit $LiAlH_4$ erhalten.

Die Darstellung von Benzoylphosphat erfolgte nach einer modifizierten Vorschrift von AVISON (1955).

An Isotopen wurden verwendet: Glycin-(1.2-^{14}C) spez. Aktivität o,o5 mC/1,15 mg von Volk, Radiochemical Comp.; Salicylsäure-(-7-^{14}C), spez. Aktivität 14,2 mC/mMol von "The Radiochemical Centre", Amersham; Veratrumsäure-(-7-^{14}C), spez. Aktivität 22,5 mC/mMol von "Commissariat a l'Energie atomique", Gif sur Yvette; Zimtsäure-(-ß-^{14}C), spez. Aktivität o,1 µC/µMol wurde dargestellt aus Benzaldehyd-(-7-^{14}C) nach BROWN und NEISH (1955); Salicylalkohol-(-7-^{14}C), spez. Aktivität 1,55 µC/µMol wurde dargestellt nach ZENK (1965) durch Reduktion von carboxylmarkierter Salicylsäure mit $LiAlH_4$; Salicylaldehyd-(-7-^{14}C) wurde durch enzymatische Reduktion der Säure mit Aryl-Aldehyd:NADP-Oxidoreduktase gewonnen.

3. Photometrische Bestimmungen

Unter Anwendung folgender Methoden wurden quantitativ bestimmt: Coenzym A enzymatisch mit Phosphotransacetylase oder Thiokinase (Acyl-CoA-Ligase) nach MICHAL und BERGMEYER (1962) oder colorimetrisch nach STADTMAN (1957); ATP enzymatisch nach THORN et al. (1955); ADP und AMP enzymatisch nach ADAM (1962); Orthophosphat und Pyrophosphat nach enzymatischer Spaltung durch anorganische Pyrophosphatase colorimetrisch nach FISKE und SUBBAROW (1925); Benzoylphosphat und Acyl-CoA-Ester colorimetrisch nach LIPMANN und TUTTLE (1945). Der Proteingehalt von Enzymlösungen wurde bestimmt nach LOWRY et al. (1951); bei höher gereinigten Enzymen - speziell nach säulenchromatographischen Trennungen - erfolgte die Bestimmung durch Absorptionsmessung bei 28o und 26o mµ nach WARBURG und CHRISTIAN (1942). Enzymaktivitäten wurden wie folgt bestimmt: Acyl-CoA-Ligase im optischen Test nach MICHAL und BERGMEYER (1962); Myokinase und ATPasen mit einem optischen Test nach ADAM (1962); Pyrophosphatase und Phosphatasen colorimetrisch nach FISKE und SUBBAROW (1925).

4. Messung der Radioaktivität

Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte im Scintillationszähler "Unilux" der Firma Nuclear Chicago. Die Zählgläschen aus kaliumarmen Glas enthielten neben der zu messenden Probe 5 ml einer Lösung der käuflichen Scintillatoren PPO und POPOP in Toluol. Die Bestimmung der Zählausbeute erfolgte durch Einspritzen von 5o µl Toluol-($-^{14}C$) bekannter Radioaktivität mit Hilfe einer Hamiltonspritze und nochmaligem Auszählen der Proben. Die Ausbeuten betrugen im allgemeinen 79-81 %.

Die Radioaktivität wässriger Lösungen wurde im Scintillationszähler mit Hilfe von 5 ml Brayscher Lösung (WENZEL und SCHULZE, 1962) bestimmt.

Chromatogramme mit radioaktiven Zonen wurden ausgewertet mit einem Dünnschichtscanner FB 272o der Firma Berthold mit angeschlossenem Linienschreiber.

5. Nachweis aktivierter Zimtsäureester durch den Hydroxamsäuretest

Die enzymatische Aktivierung der Zimtsäuren wurde durch den Hydroxamsäuretest nach LIPMANN und TUTTLE (1945) bestimmt. Dazu befanden sich in einem Reaktionsvolumen von 1 ml: 1oo µMol Tris-HCl, pH 7,6; 2,5 µMol der betreffenden Säure; 1o µMol $MgCl_2$; 75o µMol Hydroxylamin; 2o µMol Glutathion, reduziert; 1o µMol ATP; o,25 µMol CoA; 3 mg Acyl-CoA-Ligase (11 mE/mg Protein).

Die Reaktion wurde nach 6o Min. Inkubation bei 37° durch Zugabe von 2,o ml Eisen-III-Chlorid-Reagens nach BERG (1962) beendet und die Extinktion des Eisenkomplexes der betreffenden Hydroxamsäure photometrisch bei 54o mµ bestimmt. Als Blindwert wurde jeweils eine Probe ohne Enzym und CoA mitgeführt. Dieses Verfahren war auf Kaffee- und Sinapinsäure nicht anwendbar, da Eisen-III-Chlorid bereits mit der freien Säure eine tief gefärbte Verbindung ergibt.

6. Darstellung von Zimthydroxamsäuren

Zimthydroxamsäure wurde nach einer entsprechenden Vorschrift für Benzohydroxamsäure dargestellt (HAUSER und RENFROW, 1959); als Ausgangsmaterial diente Zimtsäureäthylester. Das Produkt wurde durch zweimaliges Umkristallisieren aus 7,5 %iger Essigsäure und anschließendes Umkristallisieren aus Chloroform gereinigt. Schmp.: 118°.

Unter den Bedingungen des Hydroxamsäuretests (s.o.) ermittelten wir einen Extinktionskoeffizienten ε_{540} von $1{,}54 \cdot 10^6$ cm^2/Mol. Das Absorptionsmaximum des Eisenchloridkomplexes der Zimthydroxamsäure liegt zwischen 530 und 550 mμ.

Die übrigen Zimthydroxamsäuren wurden über den entsprechenden Methylester dargestellt. Dazu wurden 20 mg der betreffenden Zimtsäure in 4 ml Methanol gelöst, mit einem Tropfen konzentrierter Schwefelsäure versetzt und 4 Stdn. am Rückflußkühler erhitzt. Nach Abdampfen des Methanols wurde der Rückstand in Äther aufgenommen und die nicht umgesetzte Säure mit 0,5-m. Bikarbonatlösung extrahiert. Nach dem Waschen mit Wasser wurde die ätherische Lösung eingeengt und der zurückbleibende Methylester mit 1 ml salzfreier Hydroxalaminlösung (HAUSER und RENFROW, 1959) versetzt. Nach einer Reaktionsdauer von 60 Min. wurde das Produkt angesäuert und durch präparative Chromatographie unter Verwendung der in Tab. 2 aufgeführten Lösungsmittel gereinigt.

7. Darstellung von Zimtsäure-CoA-Thiolestern

In einem Reaktionsansatz von 3 ml wurden inkubiert: 7,5- 30 μMol der betreffenden Säure; 300 μMol Tris-HCl, pH 7,6; 40 μMol $MgCl_2$; 60 μMol ATP; 2,75 μMol CoA; 20 mg Acyl-CoA-Ligase; Inkubation 2 Stdn. bei 30°.

Nach dem Abkühlen des Ansatzes auf 0° und Abstoppen der Reaktion mit o,3 ml 2-n. HCl wurde das denaturierte Protein abzentrifugiert und der Überstand zur Entfernung der nicht umgesetzten Säure dreimal mit je 4 ml Äther extrahiert. Zur Isolierung der CoA-Ester wurde nun entweder die gesamte wässerige Phase auf Whatman-3-Papier übertragen und chromatographiert oder mit 4 mal 3 ml eines Phenol-Benzylalkoholgemischs = 3:1 (g/g) extrahiert, die phenolische Phase mit dem vierfachen Volumen Chloroform versetzt und die entstehende weiße Trübung mit 5 mal o,4 ml Wasser ausgeschüttelt. Die vereinigten wässerigen Extrakte wurden nach Gefriertrocknung präparativ chromatographisch in den in Tab. 1 angegebenen Laufmitteln gereinigt (Whatman-3-Papier; aufsteigend). Gute Trennungen ergeben sich auch mit Äthanol:1-m. Ammoniumacetat = 5:2 (MICHELSON, 1964) und Isopropanol:Essigsäure:H_2O:NH_3 = 5o:28:2o:2 (LANE et al., 1964).

	I	II	III
Cinnamoyl-CoA	-	o,55	o,71
p-Cumaroyl-CoA	o,52	o,5o	o,75
Feruloyl-CoA	o,4o	o,48	o,7o
CoA	o,18	o,42	o,62

Tab.1: R_f-Werte von Zimtsäure-CoA-Estern.
(I) n-Butanol:Eisessig:H_2O = 5:2:3 (MICHELSON, 1964); (II) Isobuttersäure:Ammoniak:H_2O = 66:1:33 (STADTMAN, 1957); (III) Äthanol:o,1-n. Na-Acetat, pH 4,5 = 1:1 (STADTMAN, 1957).

Zur Lokalisierung und Identifizierung der Thiolester wurde das Nitroprussidreagens nach STADTMAN (1957) verwendet; die Esterspaltung erfolgte nach SEUBERT (1955) in Ammoniakatmosphäre. CoA-Ester von Säuren mit freien phenolischen OH-Gruppen ergaben eine sich bei Hydrolyse verstärkende Gelbfärbung, während sonst die übliche "verzögerte" Rotfärbung auftrat. Der Nachweis der phenolischen OH-Gruppen erfolgte durch Sprühen mit diazotierter Sulfanilsäure (BRAY et al., 195o).

Die Ausbeute an reinem Thiolester betrug 1o bis 25 % des eingesetzten CoA. Zur Synthese radioaktiv markierter Zimtsäure-CoA-Thiolester wird das Verhältnis von Zimtsäure-($-^{14}C$) zu CoA vorteilhaft auf 1:1 verringert.

8. Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten der Zimtsäure-CoA-Thiolester

Das UV-Spektrum der Zimtsäure-CoA-Ester zeigt außer dem typischen Absorptionsmaximum bei 26o mμ noch einen auf die Thiolestergruppierung zurückgehenden charakteristischen Gipfel im langwelligen UV-Bereich. Die spezifische Extinktion bei dieser Wellenlänge ist wichtig für die Mengenbestimmung (vgl. z.B. MICHAL und BERGMEYER, 1962). Zur Ermittlung dieses Maximums wurde Versuchsansätzen (1o μMol $MgCl_2$; 7,5-15 μMol Säure; 15 μMol ATP; 1,25 mg Acyl-CoA-Ligase; o,1-m. Tris-HCl, pH 7,6 ad 3 ml Gesamtvolumen) eine exakt mit Thiokinase und Phosphotransacetylase bestimmte Menge an CoA zugesetzt (ca. o,75 μMol). Die Extinktionszunahme im Absorptionsmaximum der Thiolesterbindung wurde bestimmt und die Reaktion bis zum Stillstand verfolgt. Aus diesen Werten wurde der molare Extinktionskoeffizient nach der Gleichung

$$\varepsilon = \frac{\Delta E \cdot V}{d \cdot C}$$

(E = Extinktionsdifferenz; V = Testvolumen in ml; d = Lichtweg in cm; C = eingesetzte CoA-Menge in Mol) errechnet. Bei quantitativer Reaktion, die bei den angegebenen Konzentrationen der Reaktanden erfolgt (MICHAL und BERGMEYER, 1962), ist die eingesetzte CoA-Menge der gebildeten Menge an Thiolester gleichzusetzen. Die Ausbildung eines Gleichgewichts zwischen den Reaktionspartnern wurde mit Sicherheit durch Zusatz einer definierten Menge an Cinnamoyl-CoA zu einem kompletten Testansatz ausgeschlossen; es konnte keine Verringerung der Thiolesterkonzentration festgestellt werden. Darüber hinaus wurde bei sehr langsam reagierenden Säuren

eine etwa noch nicht umgesetzte Menge an CoA quantitativ nach STADTMAN (1957) bestimmt und dieser Wert in die Berechnung der spezifischen Extinktion mit einbezogen; der dabei auftretende Bestimmungsfehler mußte in Kauf genommen werden.

9. Bestimmung der Hydrolysenkonstanten von Zimtsäure-CoA-Estern

Die Hydrolysenkonstanten der gereinigten Zimtsäure-CoA-Ester wurden nach EGGERER und LYNEN (1962) bestimmt. Dabei zeigte sich, daß besonders bei Säuren mit freien OH-Gruppen bei alkalischer Hydrolyse gefärbte Polymerisationsprodukte auftreten, wodurch die optische Bestimmung der Hydrolysenkonstanten und des Hydrolysenspektrums unmöglich werden. In diesen Fällen (z.B. p-Cumaroyl-CoA) wurde die Spaltung der Thiolesterbindung durch Hydroxylaminolyse bei pH 7,5 verfolgt.

10. Konjugierung von Zimtsäuren mit Glycin

Zum Nachweis der Konjugierung der Zimtsäuren mit Glycin im zellfreien System wurden diese mit Glycin-(-1,2-^{14}C) und einer Proteinfraktion aus Rinderlebermitochondrien inkubiert, die neben Acyl-CoA-Ligase auch Acyl-CoA:Glycin-N-Acyltransferase enthielt. Unter den in Tab. 5 aufgeführten Bedingungen wurde inkubiert; nach Beendigung der Reaktion wurde das Protein mit 0,2 ml 3-m. Perchlorsäure ausgefällt, abzentrifugiert und der Ansatz viermal mit je 1,5 ml Äther : Äthylacetat = 6:1 extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte mit dem Zimtsäure-Glycin-Konjugat wurden zweimal mit jeweils 1 ml Wasser gewaschen, der Äther abgedampft, der Rückstand in 1,0 ml absolutem Methanol aufgenommen und an einem Aliquot die Radioaktivität bestimmt. Durch Dünnschichtchromatographie (Kieselgel GF_{254}) in verschiedenen Laufmitteln (vgl. Tab.5) wurde nachgewiesen, daß der Extrakt frei von möglicherweise mitgeschlepptem Glycin

war, so daß aus der spezifischen Aktivität des eingesetzten Glycins die Menge des gebildeten Acyl-N-Glycins berechnet werden konnte.

11. Disc-Elektrophorese in Polyacrylamidgel

Reinheitsprüfungen von Proteinpräparationen durch analytische Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurden nach MAURER (1968) durchgeführt. Verwendet wurde Trenngel Nr. 1a; als Pufferlösung diente Tris-Glycin-Puffer, pH 8,3. Zum Anfärben der Proteinbanden wurde eine 1%ige Lösung von Amidoschwarz in 7 %iger Essigsäure verwendet. Die Entfernung des ungebundenen Farbstoffs aus den Proben erfolgte elektrophoretisch.

III. ERGEBNISSE

A. Darstellung und Eigenschaften von Coenzym A-Estern aromatischer Säuren

Wie in der Einleitung bereits gesagt wurde, fordert man auf Grund vergleichend biochemischer Überlegungen das intermediäre Auftreten von Coenzym A-Estern aromatischer Säuren im Biosyntheseweg einer Vielzahl von Inhaltsstoffen höherer Pflanzen. Neben der bereits erwähnten Reduktion der Zimtsäuren gilt dies auch für die Flavonoidbiosynthese, bei der seit langem die Kondensation von Zimtsäure-CoA-Estern mit drei Molekülen Acetyl-CoA (BIRCH und DONOVAN, 1953) oder Malonyl-CoA (GRISEBACH, 1965) gefordert wird. Dieser Mechanismus dürfte ebenso für die Biosynthese der Stilbene (BILLEK und KINDL, 1962) und der Piperinsäure zutreffen. Wahrscheinlich erfolgt auch die Bildung gewisser Amide, wie z.B. Feruloylputrescin (WHEATON und STEWART, 1965) oder von Estern wie Chlorogensäure unter Beteiligung aktivierter Zimtsäuren. Unter-

suchungen über den Abbau von Zimtsäuren zu Benzoesäuren, bei denen die Seitenkette der Phenylacrylsäuren um ein C_2-Bruchstück verkürzt wird, lassen auf einen Abbauweg nach dem klassischen Schema der ß-Oxidation schließen (VOLLMER et al., 1965; ZENK, 1966). Dies weist auf das Auftreten von Cinnamoyl- und Benzoyl-CoA-Estern hin. Letztere sind möglicherweise auch bei der Bildung von Flechtenstoffen, wie etwa der Gyrophorsäure, beteiligt (MOSBACH, 1967).

Der Nachweis von CoA-Estern aromatischer Säuren in der Natur ist bis jetzt nur im Falle von Benzoesäure, Phenylessigsäure und Phenoxyessigsäure gelungen (MAHLER et al., 1953; BRUNNER et al., 1968). Eine einfache Methode zur Darstellung von CoA-Estern verschieden substituierter Zimt- und Benzoesäuren kann deshalb auf Grund der zentralen Stellung dieser energiereichen Verbindungen für weitere biochemische Untersuchungen von großer Bedeutung sein.

Aus diesem Grunde sollten in der vorliegenden Arbeit die CoA-Ester von Phenylacryl- und Phenylcarbonsäuren dargestellt und charakterisiert, sowie ein optischer Test zum Nachweis der Aktivierung ausgearbeitet werden. Eine chemische Synthese dieser Verbindungen war nicht durchführbar, da für die freien phenolischen OH-Gruppen hydroxylierter Säuren geeignete Schutzgruppen fehlen, bei deren Abspaltung nicht gleichzeitig auch die empfindliche Thiolesterbindung zerstört wird (HAHLBROCK, 1965). Die gesuchten Verbindungen sollten deshalb enzymatisch dargestellt werden, was bei der Spezifität derartiger Reaktionen und wegen der im Ansatz enthaltenen geringen Konzentration an Sulfhydrylverbindungen auch eine Thioladdition an die Doppelbindung der Phenylacrylsäuren vermeiden läßt. Dieses Verfahren hat zudem den Vorteil, daß die Thiolester ohne großen experimentellen Aufwand radioaktiv mit hoher spezifischer Aktivität dargestellt werden können.

1. Nachweis der Aktivierung von Zimtsäuren durch Acyl-CoA-Ligase

Ein aromatische Säuren in ihre CoA-Ester überführendes pflanzliches Enzym ist bisher noch nicht bekannt. Nur HAHLBROCK (1965) und GRISEBACH et al. (1966) beschrieben eine mittels Hydroxamsäuretest nachgewiesene Aktivierung von Phenylpropansäuren nach Inkubation einer aus Petersilienblättern gewonnenen Proteinlösung. Es konnten jedoch nur so geringe Umsatzraten erzielt werden, daß durch diese Ergebnisse keinesfalls der gesicherte Nachweis einer Bildung von CoA-Estern aromatischer Säuren erbracht ist. Für unsere Untersuchungen wählten wir deshalb das Ferment Acyl-CoA-Ligase (EC 6.2.1.2) aus Rinderlebermitochondrien, da dieses Enzym einen weiten Substratbereich besitzt und neben einer großen Anzahl aliphatischer Säuren auch mehrere aromatische Säuren umsetzt (MAHLER et al., 1953; SCHACHTER und TAGGART, 1954; ZENK, 1960). Es war jedoch unbekannt, ob die in der Natur mit verschiedenem Substitutionsmuster auftretenden Zimtsäuren ebenfalls in die CoA-Thiolester übergeführt werden. Den Nachweis der Aktivierung konnten wir mit dem Hydroxamsäuretest führen, obwohl das zugesetzte Hydroxylamin das Enzym teilweise hemmt (MAHLER et al., 1953). Der quantitativ-photometrischen Bestimmung der gebildeten Hydroxamate wurde der für Zimthydroxamsäure ermittelte Extinktionskoeffizient zugrundegelegt. Tab. 2 zeigt die Aktivierung der verschiedenen Säuren, sowie die Rf-Werte der auf chemischem Wege gewonnenen Hydroxamsäuren nach Chromatographie in drei Laufmitteln. Unter den angegebenen Bedingungen ist Zimtsäure das reaktivste Substrat, während mehrfach kernsubstituierte Säuren in relativ geringem Maße umgesetzt werden. In Kontrollen ohne CoA oder ATP fand keine Aktivierung statt.

Säure	gebildete Hydroxamsäure (mµMol)	relative Enzym-Aktivität (%)	R_f-Werte der Hydroxamsrn.		
			I	II	III
Zimtsäure	268	1oo	o,64	o,79	o,56
o-Cumarsäure	244	91	o,5o	o,73	o,29
m-Cumarsäure	195	59	-	-	-
p-Cumarsäure	12o	45	o,42	o,66	o,21
p-Methoxyzimtsäure	136	51	o,47	o,75	o,46
Ferulasäure	97	36	o,33	o,57	o,12
Isoferulasäure	133	5o	o,34	o,55	o,17
3.4-Dimethoxy-zimtsäure	12o	45	o,38	o,61	o,32
3.4-Methylendioxy-zimtsäure	22o	82	o,43	o,7o	o,39
3.4.5-Trimethoxy-zimtsäure	97	36	o,53	o,67	o,43

Tab.2: Nachweis der Aktivierung verschiedener Zimtsäuren mit dem Hydroxamsäuretest. Reaktionsbedingungen wie im experimentellen Teil angegeben. Laufmittel I: 5 proz. Ameisensäure; II: Butanol:Eisessig:Wasser = 2o:1:4; III: Isopropanol: Ammoniak:Wasser = 8:1:1; Schleicher u. Schüll 2o43b, aufsteigend.

2. Präparative Darstellung einiger Coenzym A-Thiolester

Die für die Ligninbiosynthese wichtigsten Zimtsäuren sind p-Cumarsäure und Ferulasäure. Diese beiden Säuren, sowie Zimt- und Veratrumsäure sollten in ihre CoA-Ester überführt und präparativ gewonnen werden. Die Ansätze wurden, wie unter Material und Methoden angegeben, inkubiert und aufgearbeitet. Zur Charakterisierung der papierchromatographisch in mindestens zwei Laufmitteln gereinigten Thiolester wurden ihre Absorptionsspektren in o,1-m. Kaliumphosphatpuffer, pH 7,o ermittelt.

In den Abb. 1-4 sind die Absorptions-, Hydrolysen- und Differenzspektren der CoA-Verbindungen dieser Säuren dargestellt.

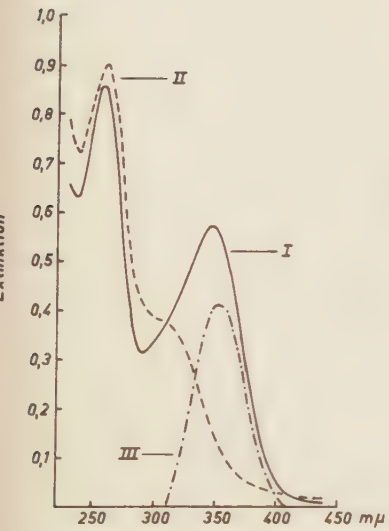

Abb.1:

UV-Spektrum von Veratroyl-CoA in o,1-m. Phosphatpuffer, pH 7,o (I), Spektrum nach Hydrolyse in o,1-m. NaOH (II) und Differenzspektrum (III).

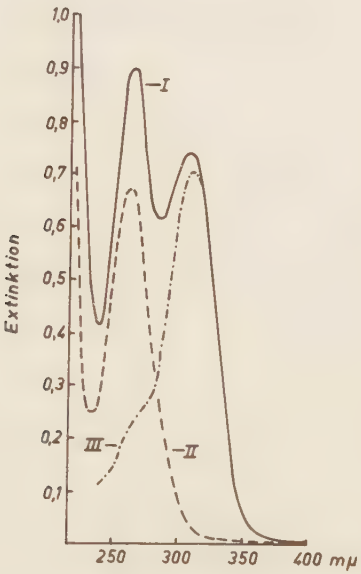

Abb.2:

UV-Spektrum von Cinnamoyl-CoA (34 mμMol/ml) in o,1-m. Phosphatpuffer, pH 7,o (I), Spektrum nach Hydrolyse in o,1-m. NaOH (II) und Differenzspektrum (III).

Wie sich aus dem Absorptionsspektrum der gereinigten Thiolester ergab, zeigen diese Verbindungen im langwelligen UV-Bereich eine charakteristische Absorption, die bei Hydrolyse verschwindet. Im Gegensatz zu aliphatischen CoA-Estern liegt das Maximum des Differenzspektrums nicht bei 22o-232 mμ (STADTMAN, 1957), sondern je nach dem Substitutionsgrad der Säure zwischen 3lo-365 mμ; ein ähnliches Verhalten wurde von SCHACHTER und TAGGART (1953) für Benzoyl-CoA (λE_{max} 272 mμ)

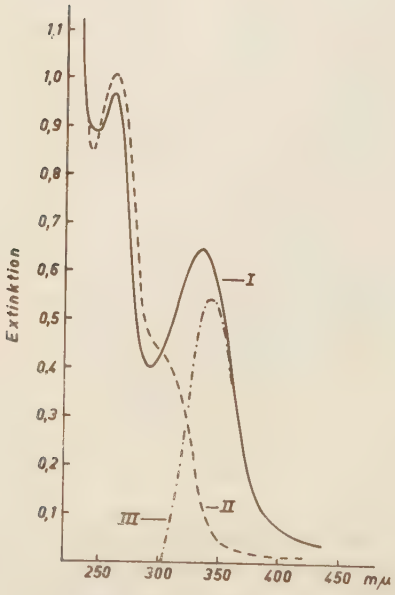

Abb.3:

UV-Spektrum von p-Cumaroyl-CoA (3o mμMol/ml) in o,1-m. Phosphatpuffer, pH 7,o (I), Spektrum nach Hydroxylaminolyse in 1-m. NH_2OH, pH 7,5 (II) und Differenzspektrum (III).

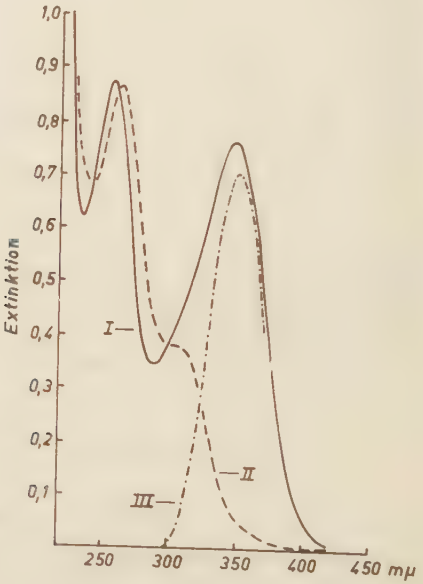

Abb.4:

UV-Spektrum von Feruloyl-CoA (41 mμMol/ml) in o,1-m. Phosphatpuffer, pH 7,o (I), Spektrum nach Hydrolyse in o,1-m. NaOH (II) und Differenzspektrum (III).

nachgewiesen. Die Einführung eines aromatischen Kerns in den Thiolester hat demnach einen bathochromen Effekt zur Folge. Die stärkste Verschiebung in den langwelligen UV-Bereich zeigen Acyl-CoA-Verbindungen, in denen der Benzolring eine phenolische OH-Gruppe trägt, die offenbar als sogenanntes Auxochrom die Ausbildung chinoider Strukturen erleichtert und dadurch eine besondere Farbvertiefung ermöglicht. Zur weiteren Charakterisierung der CoA-Ester wurden die Hydrolysengeschwindigkeit K_{NaOH} von Cinnamoyl-CoA in o,1-m. NaOH, die Geschwindigkeit der Hydroxylaminolyse K_{NH_2OH} von Cinnamoyl- und p-Cumaroyl-CoA in 1-m. NH_2OH, pH 7,5, sowie die zugehörigen Halbwertszeiten $t^{1/2}$ der Esterspaltung bestimmt. Im einzelnen ergaben sich folgende Werte: Cinnamoyl-CoA: K_{NaOH} = o,44 (Min.$^{-1}$); $t^{1/2}$ = 75 Sek.; K_{NH_2OH} = o,38 (Min.$^{-1}$); $t^{1/2}$ = 12o Sek.; p-Cumaroyl-CoA: K_{NH_2OH} = o,18 (Min.$^{-1}$); $t^{1/2}$ = 24o Sek. Die graphische Darstellung der nach EGGERER und LYNEN (1962) errechneten Meßwerte zeigt Abb. 5.

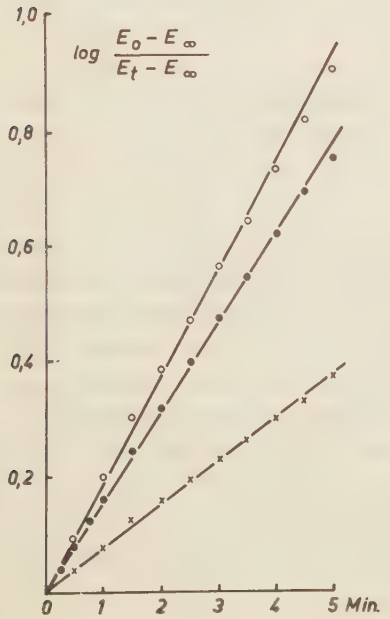

Abb. 5:

Graphische Darstellung der Thiolesterspaltung. (o) Hydrolyse von Cinnamoyl-CoA in o,1-m. NaOH; (•) Hydroxylaminolyse von Cinnamoyl-CoA; (×) Hydroxylaminolyse von p-Cumaroyl-CoA, beide in 1-m. NH_2OH, pH 7,5; E_o = Anfangsextinktion; E_t = Extinktion nach t Min. Hydrolyse; E_∞ = Extinktion nach vollständiger Hydrolyse.

3. Optischer Test zum Nachweis der Aktivierung

Die Absorption der Thiolesterbande der verschieden substituierten aromatischen Säuren zwischen 31o und 365 mμ ermöglicht einen empfindlichen optischen Test zum Nachweis ihrer Aktivierung. Dazu wird in Quarzküvetten mit den im experimentellen Teil angegebenen Reagenzien die Reaktion durch Zugabe von 1,25 mg Acyl-CoA-Ligase gestartet. Die Extinktionszunahme bei der Wellenlänge des Maximums des Differenzspektrums wird bis zum Stillstand verfolgt, was je nach Säure zwischen 15 Min. (Zimtsäure) und 8o Min. (Ferulasäure) dauern kann. Als Vergleichslösung dient ein Ansatz, der lediglich die Säure und Puffer enthält, da keine andere Komponente des Inkubationsgemisches in diesem Wellenlängenbereich absorbiert. Die Auswertung kann nun entweder nach der Endwertmethode oder auf kinetischer Basis erfolgen. Die Reaktion ist, nach beiden Methoden ausgewertet und mit 3.4-Methylendioxyzimtsäure als Substrat, für CoA-Mengen in einem untersuchten Bereich zwischen 8 und 15o mμMol/ml Testansatz und für Proteinmengen von 9 bis 5oo μg/ml linear. Die Geschwindigkeit der Thiolesterbildung steigt linear mit dem pH-Wert an (untersuchter Bereich pH 7,4 - 9,o; Tris-HCl-Puffer); jedoch ist bei pH-Werten über 8,o mit zunehmender Oxidation der freien SH-Gruppe des CoA zu rechnen.

Von großem Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit ist die gewählte Säurekonzentration. 1o μMol pro ml Testansatz ergeben - mit Ausnahme von m-Cumarsäure und 3.4-Methylendioxyzimtsäure - deutliche Substrathemmung, die im Falle der Ferulasäure bis zu 8o % beträgt. Abb. 6 zeigt die Konzentrationsabhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit für 3.4-Methylendioxyzimtsäure und p-Cumarsäure. Die Optima liegen bei allen untersuchten Säuren bei ca. 2,5 μMol/ml.

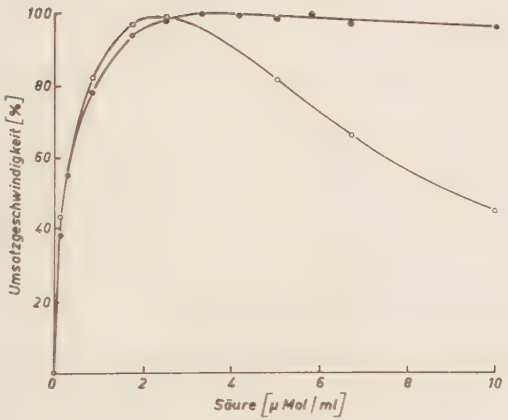

Abb.6:

Abhängigkeit der Bildungsgeschwindigkeit der Cinnamoyl-CoA-Ester von der Substratkonzentration. (•) 3.4-Methylendioxyzimtsäure; (o) p-Cumarsäure.

Wie ROSSI und GIBSON (1964) gezeigt haben, findet bei Katalyse durch Lebermitochondrienextrakte auch eine GTP-abhängige Aktivierung von Fettsäuren statt, wobei als Endprodukte die Acyl-CoA-Thiolester, sowie GDP und anorganisches Phosphat auftreten. Daher wurde die Aktivierung von Zimtsäure und 3,4-Methylendioxyzimtsäure in Abhängigkeit von verschiedenen Nucleosidtriphosphaten untersucht. ATP erwies sich als das bei weitem wirksamste Coenzym (Tab. 3).

Eine Zusammenstellung der mit Hilfe des optischen Tests ermittelten wichtigsten Charakteristika verschiedener Coenzym-A-Ester von Phenylacrylsäuren zeigt Tab. 4. Es fällt auf, daß das Absorptionsmaximum der Thiolesterbande bei zunehmender Kernsubstitution vom langwelligen UV-Bereich bis in den

Nucleosid-triphosphat	Cinnamoyl-CoA (mμMol.Min.$^{-1}$)	relative Enzym-Aktivität (%)	3.4-Methylendioxy-cinnamoyl-CoA (mμMol.Min.$^{-1}$)	relativ Enzym-Aktivität (%
ATP	13,5	1oo	9,2	1oo
CTP	o,2	1	o	o
GTP	1,6	12	o	o
ITP	2,7	2o	o,7	8
UTP	1,o	7	o,6	7

Tab.3: Nucleotidabhängigkeit der Thiolesterbildung im optischen Test. Reaktionsansatz: 1o μMol $MgCl_2$; 3o μMol Säure; 15 μMol Nucleosidtriphosphat; o,25 μMol CoA; 1,25 mg Acyl-CoA-Ligase; o,1-m. Tris-HCl, pH 7,6 ad 3 ml Gesamtvol.

Schwingungsbereich blauen Lichts verschoben wird. So wurden beispielsweise für die Reihe Cinnamoyl-CoA - p-Cumaroyl-CoA - Kaffeoyl-CoA Maxima bei 311, 333 und 363 mμ gemessen. Die bei der Wellenlänge des Absorptionsmaximums bestimmten molaren Extinktionskoeffizienten ε zeigen in ihrer Größenordnung gute Übereinstimmung mit den Angaben von STADTMAN (1957) über eine Vielzahl von Thiolestern oder dem von MICHAL und BERGMEYER (1962) für Sorbyl-CoA (ε_{300} = 23,53. $1o^6$ cm^2/Mol) gefundenen Wert. So bestimmten wir beispielsweise für Cinnamoyl-CoA einen Wert von ε_{311} = 22.$1o^6$. Diese hohen Extinktionskoeffizienten verleihen dem beschriebenen optischen Test eine große Empfindlichkeit, die auch die Umsetzung kleinster Substratmengen erfassen läßt. So kann z.B. noch die Bildung von o,96 mμMol p-Methoxycinnamoyl-CoA, entsprechend einer Extinktionszunahme von ΔE = o,o25 verläßlich gemessen werden.

Von großem Einfluß auf die Reaktion sind Zahl, Art und Position der Kernsubstituenden. p-Hydroxylierung setzt die Umsatzgeschwindigkeit der Substrate gegenüber dem unsubstituierten Ring erheblich herab. Ist die p-ständige phenolische Gruppe jedoch methylier

CoA-Ester der	Kernsubstitution	λ_{max} (mμ)	$\varepsilon\lambda_{max}$ ($\frac{cm^2}{Mol}$)	Umsatzgeschw. (mμMol. .Min.$^{-1}$)
Zimtsäure	-	311	22.10^6	13,5
o-Cumarsäure	2-OH	351	-	-
m-Cumarsäure	3-OH	33o	11.10^6	5,5
p-Cumarsäure	4-OH	333	23.10^6	1,o
p-Methoxyzimtsäure	4-OCH_3	339	27.10^6	11,2
Kaffeesäure	3.4-OH	363	13.10^6	1,9
Ferulasäure	3-OH, 4-OCH_3	345	19.10^6	o,1
Isoferulasäure	3-OCH_3,4-OH	351	18.10^6	3,7
3.4-Dimethoxyzimtsäure	3.4-OCH_3	346	24.10^6	1,1
3.4-Methylendioxyzimtsäure	3.4-OCH_2O	355	21.10^6	9,9
3.4.5-Trimethoxyzimtsäure	3.4.5-OCH_3	342	9.10^6	o,5

Tab.4: Absorptionsmaxima, molare Extinktionskoeffizienten und Bildungsgeschwindigkeiten von Zimtsäure-CoA-Thiolestern.

steigt die Umsatzgeschwindigkeit wieder stark an. Ein ähnliches Verhalten zeigen z.B. auch die Isomeren Ferula- und Isoferulasäure. Hier wird die Verbindung mit methoxylierter p-Stellung mindestens 35mal schneller umgesetzt. Ganz allgemein ist die Reaktionsgeschwindigkeit disubstituierter Säuren wesentlich verringert. Noch stärkere Hemmwirkung zeigen trisubstituierte Zimtsäuren. Sinapinsäure wird z.B. so langsam umgesetzt, daß eine Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten nicht möglich war. Abweichend von den anderen Substraten verhält sich o-Cumarsäure. Diese wird zwar, wie schon der Hydroxamsäuretest zeigt, sehr gut umgesetzt, ihr CoA-Thiolester reagiert jedoch offenbar zu einer Verbindung weiter, die wir wohl isolieren, aber noch nicht identifizieren konnten; es handelt sich bei dieser Substanz nicht um Cumarin.

4. Konjugation von Zimtsäuren mit Glycin

Im menschlichen Urin wurden Konjugate zwischen Glycin und verschiedenen Zimtsäuren aufgefunden (ARMSTRONG et al., 1956). Diese Substanzen lassen in Analogie zur Biosynthese der Hippur- (SCHACHTER und TAGGART, 1953) und Indolacetursäure (ZENK, 1960), sowie des Benzoylornithins (MARSHALL und KOEPPE, 1964) auf die Existenz von Zimtsäure-CoA-Estern auch im Tier schließen. Dabei dürften die aktivierten Zimtsäuren enzymatisch mittels Acyl-CoA : Glycin-N-Acyltransferase (EC 2.3.1.13) auf Glycin übertragen werden. Auch dieses Enzym findet sich in Extrakten aus Rinderlebermitochondrien (SCHACHTER und TAGGART, 1954).

Eine Inkubation von Zimtsäuren unter den bei Tab. 5 angegebenen Bedingungen bewies nun, daß in vitro die aktivierten Phenylacrylsäuren mit Glycin konjugiert werden können. Die auf diese Weise radioaktiv markiert gewonnenen N-Glycin-Derivate wurden in der im experimentellen Teil beschriebenen Weise aus dem Reaktionsgemisch extrahiert und anschließend chromatographiert. Die Umsatzrate der einzelnen Zimtsäuren mit Glycin und die R_f-Werte der Acyl-N-Glycin-Konjugate sind in Tab. 5 zusammengefaßt. Kontrollen ohne ATP oder CoA ergaben im Ätherextrakt des Inkubationsgemisches keine Radioaktivität. Um die Natur des Reaktionsprodukts weiter zu erhärten, wurde chromatographisch gereinigtes Cinnamoyl-N-Glycin-(-1.2-^{14}C) zwei Stunden lang mit 2-n. HCl am Rückflußkühler erhitzt. Die erneute Chromatographie des Hydrolysates ergab zwei mit authentischem Material gleichlaufende Substanzflecke von Zimtsäure und Glycin; nach Auswertung mit dem Dünnschichtscanner wurde die gesamte Radioaktivität beim R_f-Wert des Glycins gefunden.

Auch bei der Bildung von Glycinkonjugaten reagiert wieder die Zimtsäure ohne Kernsubstitution am schnellsten. Erstaunlich ist die hohe Umsatzrate von Kaffesäure in diesem System. Sinapinsäure wird ebenfalls mit Glycin konjugiert, allerdings

twa loomal langsamer als Zimtsäure; die R_f-Werte dieses Sinapoylglycins konnten jedoch wegen der geringen Radioaktivität nicht ermittelt werden.

Säure	gebildetes Acyl-N-Glycin (mμMol)	relative Enzym-Aktivität (%)	R_f-Werte der Glycinderivate		
			I	II	III
Zimtsäure	57o	1oo	o,78	o,25	o,48
o-Cumarsäure	1o	2	o,72	o,63	o,67
p-Cumarsäure	12o	21	o,86	o,17	o,27
o-Methoxyzimtsäure	124	22	o,83	o,65	o,49
Kaffesäure	17o	3o	o,17	o,26	o,31
Ferulasäure	2o	4	o,79	o,11	o,29
Isoferulasäure	1o	2	-	o,43	-
3.4-Dimethoxyzimtsäure	12	2	o,o9	o,57	o,98
3.4-Methylendioxyzimtsäure	216	4o	o,8o	o,7o	o,5o
Sinapinsäure	6	1	-	-	-
3.4.5-Trimethoxyzimtsäure	18	3	o,8o	o,27	o,41

Tab.5: Bildung von Zimtsäure-N-Glycin-Konjugaten. Reaktionsansatz: 1oo μMol Tris-HCl, pH 8,o; 1o μMol Säure; 5o μMol Glycin-(1.2-^{14}C) = 2 μC; 3 μMol $MgCl_2$; 1o μMol GSH; 1o μMol ATP; o,33 μMol CoA; 5 mg Protein; Gesamtvol. 1 ml; Inkubation 2 Stdn. bei 38°. Laufmittel I: Butanol:Eisessig = 8:2; II: Benzol:Eisessig = 8:2; III: Toluol:Äthylformiat:Ameisensäure = 5:4:1.

us diesen Versuchen kann geschlossen werden, daß sich auch ie Konjugierung der Zimtsäuren nach dem Schema der Hippursäureiosynthese vollzieht. Es ist somit gesichert, daß in vivo - umindest im tierischen Organismus - Zimtsäure-CoA-Thiolester ls energiereiche Zwischenprodukte auftreten.

B. Reduktion aromatischer Säuren in vivo

1. Bildung von Salicylalkohol aus Salicylsäure durch Mycelien von Neurospora crassa

Wie bereits in der Einleitung erwähnt wurde, konnten BACHMANN et al. 1960 die Reduktion von Salicylsäure zum Alkohol durch Neurospora crassa nachweisen. Es galt nun zunächst, das Auftreten von Salicylalkohol im Kulturmedium und das Wachstum der Mycelien in ihrem zeitlichen Verlauf zu erfassen, da dies im Hinblick auf einen eventuellen Nachweis reduzierender Enzyme von Wichtigkeit erschien. Dazu wurden mit Konidien beimpften Kolben mit steriler Nährlösung, die Salicylsäure-(-7-^{14}C) in 1.25 . 10^{-3} und 2,5 . 10^{-3}-m. Konzentration enthielten, in Abständen von sechs Stunden Proben entnommen. An diesen wurden die Trockengewichte der Mycelien nach Absaugen des Kulturmediums durch bakteriendichte Filter (Fa. Sartorius, Göttingen) bestimmt. Die im Filtrat enthaltene Menge an Salicylalkohol wurde in der für die Aktivitätsbestimmung der Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase ausführlich beschriebenen Weise (vgl. Kapitel C.1) ermittelt. Wie die Abb.7 zeigt, setzt die Reduktion wesentlich später als das Wachstum des Pilzes ein, erreicht jedoch dann sehr schnell einen Endwert, der einer ca. 65%igen Reduktion entspricht; nach ungefähr drei Tagen ist die eingesetzte Säure größtenteils reduziert. Auffällig ist die Stagnation des Wachstums der Mycelien beim Einsetzen der Alkoholbildung. Es wäre denkbar, daß dieser Effekt mit einer möglichen Neubildung reduzierender Enzyme in Zusammenhang steht; die Wachstumsverminderung könnte dabei durch eine Verlagerung der auf die Neubildung organischer Substanz ausgerichteten Stoffwechselaktivität zugunsten der bevorzugten Umformung bereits vorhandenen Proteins zu erklären sein.

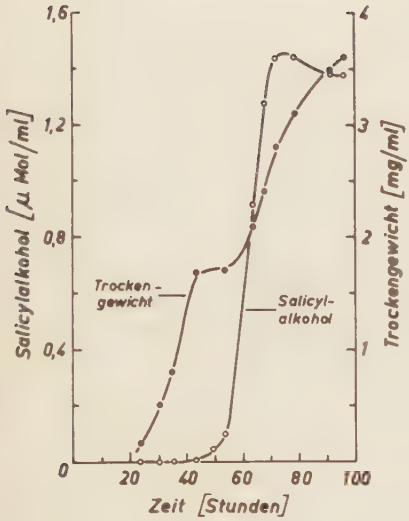

Abb. 7:

Kinetik des Mycelwachstums und der Bildung von Salicylalkohol aus Salicylsäure durch Neurospora crassa. Nähere Angaben im Text. Ursprüngliche Salicylsäurekonzentration 2.5 . 10^{-3} Mol/ltr.

In gleicher Weise durchgeführte Versuche mit höheren Konzentrationen an Salicylsäure (bis 10^{-2} Mol/ltr.) zeigten, daß auch in diesen Fällen die eingesetzte Säure noch fast vollständig reduziert wird (Abb. 8). Bemerkenswert ist eine zur Erhöhung der Substratkonzentration parallel verlaufende Hemmung des Mycelwachstums. So beträgt etwa bei Anwendung einer Salicylsäurekonzentration von 10^{-2} Mol/ltr. im Kulturmedium die durch Trockengewichtsbestimmung ermittelte Ausbeute an Pilzmycelien nur ca. 25 % des bei Inkubation mit 1.25 . 10^{-3}-m. Säure erhaltenen Wertes. Die Tatsache dieser verstärkten Bildung von Salicylalkohol bei gleichzeitigem geringeren Proteingehalt der Mycelien bedeutet, daß der relative Anteil reduzierender Enzyme durch Erhöhung der Substratkonzentration gesteigert wird.

Dies läßt auf die Induktion eines oder mehrerer die Alkoholbildung bewirkender Enzyme schließen.

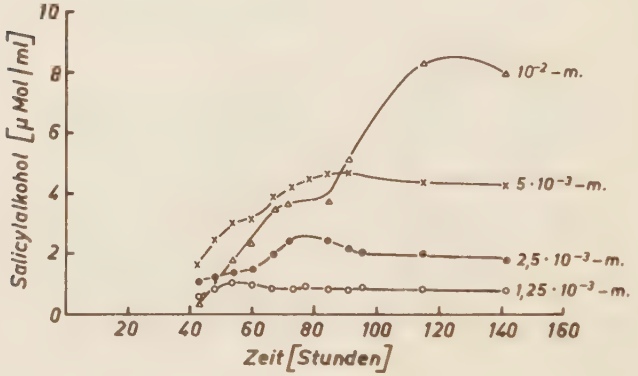

Abb.8:

Zeitlicher Verlauf der Reduktion von Salicylsäure zu Salicylalkohol durch Mycelien von Neurospora crassa in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen an eingesetzter Säure. Die angegebenen Molaritäten beziehen sich auf die Anfangskonzentration der Salicylsäure im Kulturmedium.

Die Reduktion aromatischer Säuren in vivo ließ sich nur bei Inkubation mit Salicylsäure erreichen. Ätherextrakte, die aus Kulturmedien nach Applikation von p-Hydroxybenzoesäure, Anissäure, Veratrumsäure, Vanillinsäure oder 3.4.5-Trimethoxybenzoesäure erhalten worden waren, wurden dünnschichtchromatographisch analysiert (Kieselgel GF_{254}, Fa. Merck; Laufmittel Toluol:Äthylformiat:Ameisensäure = 5:4:1). Als Vergleichssubstanzen dienten die den Säuren entsprechenden Aldehyde und Alkohole. In keinem Falle ergab sich ein Hinweis auf die Bildung von Reduktionsprodukten

dieser Säuren. Erfolgt im übrigen die Zugabe von Salicylsäure in das Kulturmedium erst in der stationären Wachstumsphase, so läßt sich ebenfalls keine Alkoholbildung beobachten.

2. Untersuchungen an anderen Organismen

FARMER et al. (1959) konnten bei dem Basidiomyceten Polystictus (Trametes) versicolor ein bemerkenswertes Reduktionsvermögen nachweisen. Im Gegensatz zu Pilzen, die Methoxybenzoesäuren hydroxylieren und unter Ringspaltung weiter abbauen (HENDERSON, 1957), wurden diese Säuren zu Aldehyden und Alkoholen reduziert. Zimtsäure wurde dagegen hauptsächlich via p-Cumarsäure zu nicht aromatischen Verbindungen abgebaut. Durch eigene Versuche konnten wir jedoch auch den Nachweis einer geringen Bildung von Zimtaldehyd aus der entsprechenden Säure erbringen. Dazu wurden Ätherextrakte des Kulturmediums chromatographiert (Toluol:Ameisensäureäthylester:Ameisensäure = 5:4:1; Kieselgel GF_{254}), wobei eine mit Zimtaldehyd gleichlaufende Verbindung gefunden wurde. Denselben R_f-Wert wie authentisches Material zeigte auch das aus dem Extrakt nach SHRINER et al. (1959) erhaltene 2.4-Dinitrophenylhydrazin-Derivat; als Laufmittel diente Benzol : Petroläther (30-70°) = 3:1 (Kieselgel GF_{254}; RANDERATH, 1962).

Die von RAMAN und SHANMUGASUNDARAM 1962 beschriebene Reduktion von Aminobenzoesäuren konnte von uns nicht bestätigt werden. Auch Versuche zur Reduktion von Zimt- und Benzoesäure durch Bäckerhefe brachten sowohl bei aeroben, wie auch bei anaeroben Kulturbedingungen ein negatives Ergebnis.

C. Untersuchungen zur Induktion aromatische Säuren- bzw. Aldehyde-reduzierender Enzymsysteme

Wie bereits im vorhergehenden Kapitel beschrieben wurde, hatten sich bei in vivo-Untersuchungen zur Reduktion aromatischer Säuren Anhaltspunkte ergeben, die auf eine mögliche Induktion eines oder mehrerer der an dieser Reaktion beteiligten Enzyme hinwiesen. Sollte dies zutreffen, so war es im Hinblick auf eine eventuelle Anreicherung der reduzierenden Enzyme von Wichtigkeit, den Zeitpunkt zu kennen, an dem diese im Mycel in größtmöglicher Konzentration vorliegen. Vor der Durchführung entsprechender Versuche war es jedoch nötig, die Enzyme im Rohextrakt nachzuweisen und Methoden zur exakten Bestimmung ihrer Aktivität auszuarbeiten.

1. Methoden zur Aktivitätsbestimmung von Aryl-Aldehyd- und von Aryl-Alkohol-Oxidoreduktase

1.1 Definition der Einheit der enzymatischen Aktivität

Alle in dieser Arbeit vorkommenden Angaben über Enzymeinheiten sind gemäß den Empfehlungen der "Commission on Enzymes" der "International Union of Biochemistry" errechnet (vgl. z.B. FLORKIN und STOTZ, 1965). Als 1 Einheit (E) ist demnach diejenige Enzymmenge definiert, die bei 30°, optimalem pH und sättigenden Konzentrationen der Reagenzien 1 µMol Substrat pro Minute umsetzt. Zur Vermeidung sehr kleiner Zahlenwerte werden Enzymaktivitäten im folgenden meist in milli-Einheiten (mE) angegeben; 1000 mE entsprechen 1 E.

1.2 Aktivitätsbestimmung der Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase

Die quantitative Bestimmung der Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase erfolgt nach einem Verfahren, das auch bei ungereinigten Zellextrakten anwendbar ist. Prinzip der Bestimmungsmethode

ist die Messung der im Enzymtest aus der eingesetzten Säure gebildeten Reduktionsprodukte, die sich durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln aus dem Inkubationsansatz abtrennen lassen. Als wenig sinnvoll erwies es sich, die Reaktion an Hand der der Oxidation von NADPH zu NADP entsprechenden Extinktionsabnahme bei 340 mμ photometrisch zu verfolgen. Die geringe spezifische Aktivität des Enzyms im Rohextrakt, die daraus resultierende Notwendigkeit, große Proteinmengen im Enzymtest einzusetzen, sowie die Wirkung einer Aryl-Alkohol-Oxidoreduktase bereiten bei dieser Bestimmungsmethode Schwierigkeiten. Auch für gereinigte Enzympräparationen ist der optische Test nicht allgemein anwendbar, da eine Reihe substituierter aromatischer Aldehyde beim pH-Wert des Enzymtests eine Gelbfärbung zeigt, die zu Fehlbestimmungen führt.

1.2.1 Aktivitätsbestimmung der Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase aus Neurospora crassa

Inkubationsansatz: In einem Schliffglas mit einem Fassungsvermögen von ungefähr 10 ml werden 100 μMol Tris-HCl, pH 8,0; 10 μMol $MgCl_2$; 2 μMol Dithiothreitol (Cleland Reagens); 2 μMol Salicylsäure-(-7-^{14}C) = 0,1 μC; 2 μMol ATP; 0,35 μMol NADPH und die zu messende Enzymlösung (10-30 mE) in einem Gesamtvolumen von 1,0 ml 30 Min. lang bei 30° inkubiert. Anstelle von NADPH können auch NADP-reduzierende Systeme eingesetzt werden. Diese bestehen entweder aus DL-Isocitrat (4 μMol) und Isocitrat-Dehydrogenase (0,05 mg) oder aus Glucose-6-Phosphat (2 μMol) und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (0,005 mg), sowie in beiden Fällen 0,1 μMol NADP. Bei Verwendung dieser Systeme wird mit Rücksicht auf die pH-Optima der Hilfsenzyme Trispuffer vom pH 7,6 eingesetzt.

Die enzymatische Reaktion im Ansatz wird durch Zugabe von 0,2 ml 3-m. Perchlorsäure beendet und die Säure anschließend mit derselben Menge an 3-n. KOH und Abkühlen des Gemischs im Eisbad ausgefällt. Nach Pufferung des Systems mit 1,0 ml 2-m. K-Phosphatpuffer, pH 8,0, wird die Inkubationslösung mit

genau 2,o ml eines Benzol-Äthergemischs (1:1) versetzt und 15 Min. lang extrahiert. Aus der in ein zweites Schliffgläschen überführten organischen Phase, in der die Reduktionsprodukte enthalten sind, werden anschließend Reste von Salicylsäure durch 5-minütiges Waschen mit 1,5 ml o,1-m. Phosphatpuffer, pH 8,o entfernt. Zur Bestimmung der Radioaktivität werden schließlich genau 1,o ml des Benzol-Äthergemischs abpipettiert und im Scintillationszähler die Impulsrate ermittelt.

Um die Menge an gebildetem Salicylaldehyd (bzw. -alkohol) berechnen zu können, muß die sich bei der geschilderten Extraktionsweise ergebende Ausbeute ermittelt werden. In Ansätzen mit bekannten Mengen an Salicylaldehyd, bzw. -alkohol bestimmten wir in einem untersuchten Bereich von 5-5oo mµMol eine konstante Ausbeute von 53 % (Abb. 9). Unter Berücksich-

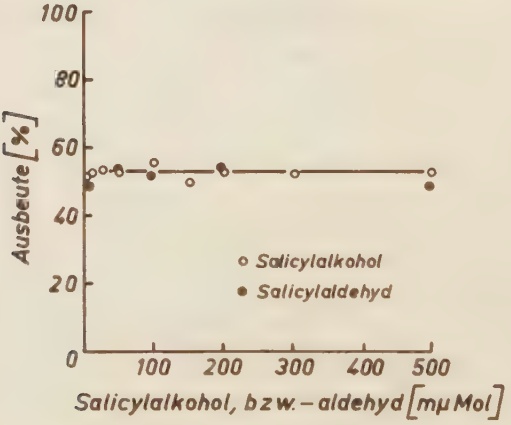

Abb. 9:

Bestimmung der Ausbeute an Salicylaldehyd, bzw. -alkohol nach Extraktion des Enzymansatzes. Steigende Mengen (5-5oo mµMol) der 7-^{14}C-markierten Verbindungen wurden in der im Text beschriebenen Weise mit 2 ml eines Benzol-Äthergemischs extrahiert und die Radioaktivität bestimmt. Die Ausbeute beträgt 53 % der eingesetzten Menge.

tigung dieses Wertes errechnet sich demnach die Menge der enzymatisch gebildeten Reduktionsprodukte bei bekannter spezifischer Aktivität der eingesetzten Säure aus der ermittelten Zählrate, multipliziert mit dem Faktor 2 (es wird nur 1 ml der organischen Phase verwendet).

1.2.2 Weitere Methoden zur Aktivitätsbestimmung

Bei früheren Untersuchungen zur Reduktion aromatischer Säuren, die mit Extrakten aus Polystictus (Trametes) versicolor durchgeführt worden waren, bestimmten wir die Menge der gebildeten Reduktionsprodukte nach einer der beiden folgenden Methoden.

Bei Verwendung von Veratrumsäure-(-7-^{14}C) als Substrat wird nach Inkubation des Enzymtests die Reaktion durch Zugabe von o,2 ml 2-n. H_2SO_4 beendigt, der Proteinniederschlag abzentrifugiert und dem Überstand soviel 2-n. KOH zugesetzt, daß ein pH-Wert von lo erreicht wird. Durch anschließende dreimalige Extraktion der Inkubationslösung mit je 2 ml Äther werden die Reduktionsprodukte quantitativ abgetrennt. Nach Vereinigung der organischen Phasen werden diese zur restlosen Entfernung von nicht umgesetzter Säure zweimal mit je 2 ml gesättigter Natriumbikarbonatlösung gewaschen, der Äther auf einer Stahlplanchette vorsichtig abgedampft und die Radioaktivität im Methandurchflußzähler bestimmt.

Die folgende Methode wurde zur Bestimmung von nicht radioaktiv markiertem Anisaldehyd ausgearbeitet. Die enteiweißten und auf einen pH-Wert von lo gebrachten Proben werden in einem Schliffglas (Vol. lo ml) mit genau 1,7 ml eines Gemischs aus Hexan und Butanol (98:2) versetzt und 15 Min. lang extrahiert. In Quarzküvetten wird dann photometrisch bei der dem Absorptionsmaximum des Aldehyds (268 mμ) entsprechenden Wellenlänge die der Anisaldehydmenge proportionale Extinktion bestimmt. Als Blindwert dient der Hexanextrakt einer Probe ohne reduzierendes Coenzym. Die Aldehydkonzentra-

tion wird aus der gemessenen Extinktion über eine Eichkurve ermittelt. Für die angegebene Extraktionsmethode beträgt die Ausbeute an Anisaldehyd 86 % (Abb. 1o). Aus diesen Werten läßt sich die Gesamtmenge an gebildetem Aldehyd unter Berücksichtigung der eingesetzten Hexanmenge von 1,7 ml errechnen.

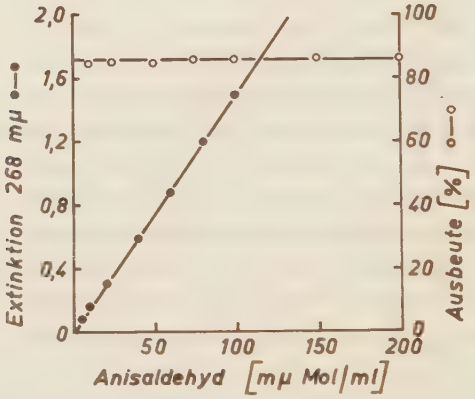

Abb.1o:

Bestimmung von Anisaldehyd durch Extraktion der Inkubationslösung mit Hexan:Butanol = 98:2. (•) Eichkurve: Extinktion steigender Konzentrationen von Anisaldehyd in dem angegebenen Gemisch, gemessen bei 268 mμ; (o) Bestimmung der Ausbeute an Anisaldehyd: Steigende Mengen an Aldehyd (1o-2oo mμMol) wurden in der im Text beschriebenen Weise extrahiert und die Konzentration über die Eichkurve bestimmt. Die Ausbeute beträgt 86 %.

1.3 Bestimmung der Aryl-Alkohol-Oxidoreduktase aus Neurospora crassa

Die photometrische Bestimmung der Aryl-Alkohol-Oxidoreduktase durch Extinktionsmessung bei 34o mμ bereitet im Gegensatz zu den oben angeführten Enzymsystemen keine Schwierigkeiten, da

dieses Enzym eine wesentlich höhere Aktivität besitzt; seine spezifische Aktivität im Rohextrakt beträgt mehr als das zehnfache des für die Aldehyd-Oxidoreduktase ermittelten Wertes. Dies erlaubt die Verwendung kleinster Proteinmengen, wodurch Störungen durch Fremdaktivitäten weitgehend vermieden werden.

Zur Aktivitätsbestimmung enthält jede Küvette (Lichtweg d = 1 cm) 2oo µMol K-Phosphatpuffer, pH 6,8; 4 µMol Anisaldehyd; o,5 µMol NADPH und Proteinlösung (ca. 2o mE) in einem Gesamtvolumen von 2,o ml. Die dem Verbrauch von NADPH äquivalente Extinktionsabnahme bei 34o mµ wird im temperierbaren Küvettenhalter des Zeiss Spektralphotometers PMQ II bei 3o° in einem Zeitraum von 15 bis 9o Sek. nach Beginn der Reaktion durch Enzymzugabe verfolgt. Als Vergleichswert dient bei Messung unreiner Enzympräparationen eine Probe ohne Aldehyd. Durch Umrechnung der ermittelten Absorptionsdifferenz mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten von NADPH (6,22 . 10^6 cm^2/Mol) läßt sich die dem NADPH-Verbrauch numerisch gleiche Menge an gebildetem Alkohol quantitativ erfassen.

Die unter Reduktion von NADP verlaufende Rückreaktion wird gleichermaßen durch Bestimmung der Extinktionszunahme bei 34o mµ in folgendem Ansatz gemessen: 2oo µMol Tris-HCl, pH 8,7; 16 µMol Anisalkohol; o,5 µMol NADP und Enzymlösung (ca. 1oo mE); Gesamtvolumen 2,o ml.

2. Nachweis reduzierender Enzyme im Rohextrakt

2.1 Reduktion von Veratrumsäure durch zellfreie Extrakte aus Polystictus (Trametes) versicolor

Die Reduktion einer aromatischen Säure zum Aldehyd und Alkohol im zellfreien System gelang erstmals mit Hilfe eines Rohextraktes aus Polystictus (Trametes) versicolor. Die Gewinnung

zellfreier Extrakte aus den Mycelien dieses Basidiomyceten ist in Abschnitt F dieser Arbeit ausführlich beschrieben. Nach Inkubation einer auf diese Weise gewonnenen Proteinlösung mit den in Abb. 11 angegebenen Reagenzien wurden die Reduktionsprodukte in der schon beschriebenen Weise extrahiert und quantitativ bestimmt. Es konnte nachgewiesen werden, daß 4,9 mµMol Veratrumsäure (= 2 730 ipm) reduziert worden waren; in Blindwerten mit hitzedenaturiertem Protein konnte keine Radioaktivität gefunden werden. Nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung der Reduktionsprodukte und anschließender Auswertung mit dem Dünnschichtscanner zeigte sich, daß im Ansatz Veratrylaldehyd und Veratrylalkohol in einem Verhältnis von etwa 2 : 1 gebildet worden waren. Der Extrakt war frei von möglicherweise mitgeschleppter Veratrumsäure (Abb. 11).

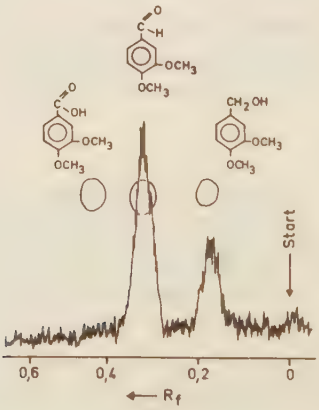

Abb. 11:

Chromatographie von enzymatisch aus Veratrumsäure gebildetem Veratrylaldehyd und -alkohol. Kieselgel GF_{254}; Laufmittel Dibutyläther:Eisessig = 91:9. Reaktionsansatz: 100 µMol Tris-HCl, pH 7,6; 2,5 µMol Veratrumsäure-(-7-^{14}C) = $2{,}2 \cdot 10^6$ ipm; 1 µMol NADH und NADPH; 5 µMol ATP; 0,5 µMol CoA; 10 µMol $MgCl_2$ und KF; 10 mg Protein; Gesamtvolumen 1 ml. Inkubationszeit 60 Min. bei 30°.

2.2 Nachweis der Reduktion von Salicylsäure durch Rohextrakte aus Neurospora crassa

Eine wesentlich höhere Umsatzrate bei der Reduktion aromatischer Säuren konnte durch Anwendung zellfreier Extrakte aus Neurospora crassa erzielt werden. Ihre Gewinnung ist im Anreicherungsverfahren der Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase beschrieben. Zum Nachweis der enzymatischen Reduktion wurden Proben mit den bei Tab. 6 angeführten Reagenzien inkubiert und die Menge der gebildeten Reduktionsprodukte in der oben beschriebenen Weise bestimmt. Die in Tab. 6 zusammengestellten Versuchsergebnisse beweisen die enzymatische Reduktion von Salicylsäure. Die chromatographische Analyse des Ätherextraktes der Inkubationslösung ergab, daß ausschließlich

Versuch A		Versuch B	
Versuchsdauer (Min.)	Salicylsäure reduziert (µMol)	Protein (mg)	Salicylsäure reduziert (µMol)
o	o	o	o
3o	o,7o	1,o	o,22
6o	1,32	5,o	1,oo
14o	1,37	9,5	1,23

Tab.6: Enzymatische Reduktion von Salicylsäure in Abhängigkeit von verschiedenen Inkubationszeiten (A) und Proteinmengen (B). Ansatz: loo µMol Tris-HCl, pH 7,6; lo µMol $MgCl_2$; 5 µMol L-Cystein; 5 µMol Salicylsäure-(-7-^{14}C) = o,5 µC; lo µMol ATP; o,1 µMol CoA; 1 µMol NADH und NADPH; Gesamtvolumen 1,o ml. Proteinmenge bei A = 9,5 mg; Inkubationszeit bei B = 6o Min.; Reaktionstemperatur 3o°.

Salicylalkohol gebildet worden war (vgl. Abb. 19). Dies ist jedoch offensichtlich auf die Wirkung einer im Rohextrakt enthaltenen Alkohol-Oxidoreduktase zurückzuführen, die den

gebildeten Aldehyd sofort weiter reduziert; eine direkte Reduktion der Säure zum Aldehyd ist vom biochemischen Standpunkt aus sehr unwahrscheinlich. Ein derartiges Enzym konnte in Extrakten aus Mycelien von Neurospora crassa nachgewiesen werden; Abb. 12 zeigt den chromatographischen Nachweis der Bildung von Salicylalkohol aus dem Aldehyd.

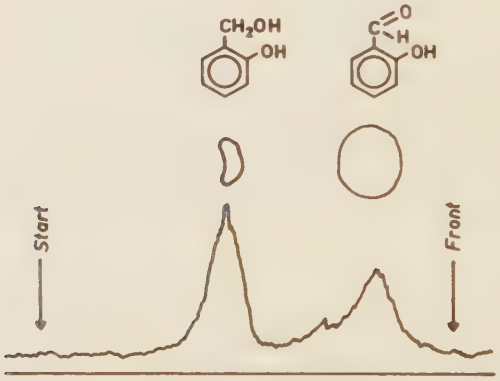

Abb. 12:

Enzymatische Reduktion von Salicylaldehyd zu Salicylalkohol. Chromatographie des Reaktionsgemischs an Kieselgel GF_{254}; Laufmittel Toluol:Äthylformiat: Ameisensäure = 5:4:1. Reaktionsansatz: loo µMol K-Phosphatpuffer, pH 6,8; 2 µMol Salicylaldehyd-(-7-^{14}C); o,1 µMol NADP; 4 µMol DL-Isocitrat; o,o5 mg Isocitrat-Dehydrogenase; 25 µg Protein; Gesamtvolumen 1 ml; Inkubation 3o Min. bei 3o°.

3. Bestimmung von Aryl-Aldehyd- und Aryl-Alkohol-Oxidoreduktase aus Neurospora crassa und Polystictus versicolor.

Nachdem die oben beschriebenen Methoden zur Aktivitätsbestimmung reduzierender Enzyme in Rohextrakten ausgearbeitet worden waren, konnte nun untersucht werden, ob und in welchem Maße diese Enzyme durch ihr Substrat induziert werden. Genauere Kenntnis hierüber war vor allem im Hinblick auf eine Anreicherung der Enzyme wichtig.

Zur Klärung dieser Frage wurde eine größere Zahl von Kolben mit steriler Nährlösung, die Salicylsäure in Konzentrationen von 10^{-2} und $5 \cdot 10^{-3}$ Mol/ltr. enthielten, mit genau gleichen Mengen einer homogenen Konidiensuspension beimpft. Als Vergleichswerte dienten Ansätze ohne Salicylsäure. An diesen Proben wurden in Abständen von acht Stunden das Frischgewicht der Mycelien und - nach Aufschluß im Ultraschall-Desintegrator - die Proteinmenge und die spezifische Aktivität der beiden an der Reduktion von Salicylsäure zu Salicylalkohol beteiligten Enzyme in ihrem zeitlichen Verlauf bestimmt.

Wie aus Abb. 13 hervorgeht, wird das Salicylsäure zum Aldehyd reduzierende Enzym durch sein Substrat induziert. Die höchste spezifische Aktivität findet sich bei Inkubation mit 10^{-2}-m. Salicylsäure. Bei Inkubation mit der halben Substratmenge zeigt sich eine Verringerung der spezifischen Aktivität der Proteinlösung um ungefähr 30 %. Andererseits ist die absolute Menge an säurereduzierendem Enzym in letzterem Falle nicht wesentlich größer, obwohl das Wachstum der Mycelien bei dieser geringen Salicylsäurekonzentration noch wenig gehemmt ist. Die Inkubation mit höheren Konzentrationen an Salicylsäure bringt deshalb für eine etwaige Reinigung des Enzyms große Vorteile; durch die auf diese Weise erzielbare höhere spezifische Aktivität der Rohextrakte wird der Anteil an abzutrennenden inaktiven Begleitproteinen bedeutend vermindert.

In den als Vergleichsproben mitgeführten Ansätzen ohne Salicylsäure ist so gut wie keine Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase enthalten; das Enzym ist nicht mehr mit Sicherheit nachzuweisen. Nach ungefähr 2 bis 2 1/2 Tagen - zu diesem Zeitpunkt ist die eingesetzte Salicylsäure fast völlig reduziert - wird in den an Salicylsäure adaptierten Mycelien das säurereduzierende Enzym wieder sehr schnell abgebaut; 9o Stunden nach Versuchsbeginn läßt sich keine oder fast keine Enzymaktivität mehr nachweisen.

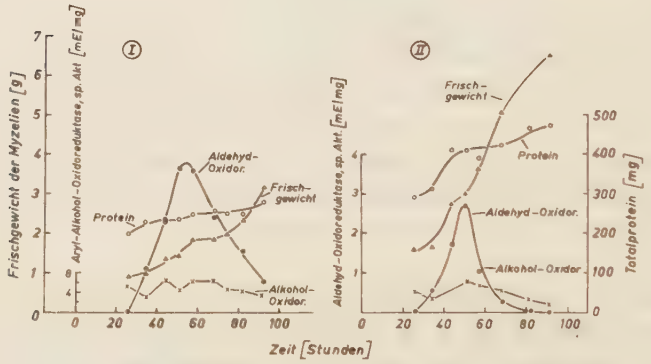

Abb. 13:

Einfluß der Salicylsäurekonzentration im Kulturmedium auf das Mycelwachstum und die spezifischen Aktivitäten von Aryl-Aldehyd- und Aryl-Alkohol-Oxidoreduktase bei Neurospora crassa. (I) $1o^{-2}$ Mol/ltr. Salicylsäure, (II) $5.1o^{-3}$ Mol/ltr. Salicylsäure.

Die spezifische Aktivität der die weitere Reduktion des gebildeten Aldehyds katalysierenden Aryl-Alkohol-Oxidoreduktase ist dagegen in allen Fällen praktisch gleich; auch im zeitlichen Verlauf läßt sich kein Hinweis auf eine Aktivierung oder Neubildung dieses Proteins erkennen.

Im Gegensatz zu der bei Neurospora crassa gefundenen induzierbaren Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase ist das analoge Enzym aus Mycelien von Polystictus (Trametes) versicolor konstitutiver Art. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität des aromatische Säuren reduzierenden Enzymsystems in Zellhomogenisaten dieses Basidiomyceten ergab keine Unterschiede zwischen unbehandelten Mycelien und solchen, die mit 10^{-2}-m. Anissäurelösung inkubiert worden waren.

D. Reinigung und Eigenschaften von Aryl-Aldehyd: NADP-Oxidoreduktase aus Neurospora crassa

1. Reinigung des Enzyms

Als Material zur Enzymgewinnung dienten Mycelien von Neurospora crassa, in denen durch Zugabe von Salicylsäure in das Kulturmedium die Bildung von Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase induziert worden war. Die Anzucht, Vorbehandlung und Aufbewahrung der Mycelien wurde bereits unter Material und Methoden beschrieben. Sämtliche im folgenden durchgeführten Arbeitsgänge wurden zur Vermeidung von Aktivitätsverlusten des Enzyms bei Temperaturen von +1 - +4° durchgeführt.

1.1 Aufschluß der Mycelien

Zum Aufschluß werden 130 g der gefrorenen Mycelien in Portionen von 5 g mit der gleichen Menge an Glaskugeln (Ø 0,25 - 0,3 mm; Dragonwerk, Bayreuth) und 20 ml 0,1-m. Tris-HCl-Puffer, pH 7,6, der 10^{-2} Mol/ltr. L-Cystein enthält, mit dem Ultraschall-Desintegrator (Branson "Sonifier" S 125) 4 Min. lang behandelt. Da hierbei beträchtliche Wärmemengen freiwerden, dient ein Gemisch aus Trockeneis und Isopropanol als Kühlbad. Das Homogenat (ca. 500 ml) wird 15 Min. bei 30 000 × g abzentrifugiert und der Überstand zu Entfernung

von Fettpartikeln durch Glaswolle filtriert. Die so gewonnenen, milchig-trüb gefärbten Rohextrakte haben einen Proteingehalt von durchschnittlich 25-3o mg/ml.

1.2 Fällung mit Protaminsulfat

Zur Entfernung der Nucleinsäuren und eines beträchtlichen Teils der inaktiven Begleitproteine aus dem Rohextrakt erwies sich eine Fällung mit Protaminsulfat als sehr vorteilhaft. Abb. 14 zeigt die Abhängigkeit der Fällungsreaktion von der Protaminsulfatkonzentration im Rohextrakt. Wie aus dem Kurvenverlauf hervorgeht, sollte ein Konzentrationsverhältnis von 5 mg Protaminsulfat pro 5o-6o mg Protein eine gute Anreicherung des aktiven Proteins bei geringen Verlusten ermöglichen.

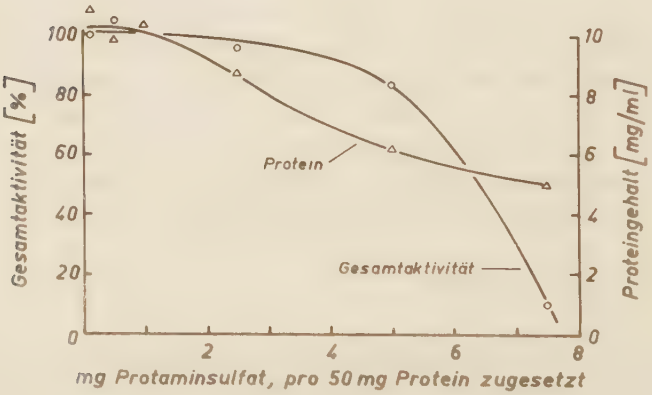

Abb. 14:

Abhängigkeit der Proteinfällung im Rohextrakt von der Protaminsulfatkonzentration. Sechs Teilen eines Rohextraktes mit einem Volumen von jeweils 5 ml (= 5o mg Protein) wurden o,1; o,5; 1,o; 2,5; 5,o und 7,5 mg Protaminsulfat zugesetzt. Nach Abzentrifugieren der Niederschläge wurden im Überstand jeder Probe der Proteingehalt und die Aktivität der Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase bestimmt.

Es zeigte sich, daß meist sogar Ausbeuten von 11o - 14o % der im Rohextrakt enthaltenen Aktivität erhalten werden (vgl. Tab. 7), was wahrscheinlich auf die Abtrennung eines die Reaktion hemmenden Proteinbestandteils zurückzuführen ist.

Dieser erste Reinigungsschritt ist folgendermaßen auszuführen: Zur Proteinlösung, die mit dem beim Aufschluß verwendeten Puffergemisch zur Vermeidung störender intermolekularer Wechselwirkungen auf eine Konzentration von 1o mg/ml verdünnt wird, läßt man unter ständigem Rühren 2 %ige Protaminsulfatlösung (1 ml pro 24o mg Protein) langsam zutropfen. Man läßt 1o Min. weiterrühren und zentrifugiert dann den Niederschlag 15 Min. bei 3o ooo × g ab. Der klare, braungefärbte Überstand besitzt durchschnittlich einen Proteingehalt von 5 mg/ml.

1.3 Fraktionierung mit Ammoniumsulfat

Zur Ermittlung derjenigen Konzentration an Ammoniumsulfat, bei der das gesuchte Enzymprotein aus dem Überstand des vorhergehenden Reinigungsschrittes ausgefällt werden kann, wurde die Proteinlösung mit festem Ammoniumsulfat stufenweise auf den Sättigungsgrad o,2; o,4; o,6 und o,8 gebracht und der erhaltene Niederschlag jeweils abzentrifugiert. Die einzelnen Fraktionen wurden in Trispuffer, pH 7,6 aufgenommen und dialysiert. Es zeigte sich, daß die Hauptmenge des aktiven Proteins (ca. 8o %) in einem Sättigungsbereich von o,4 - o,6 ausgefällt wird.

Zur weiteren Reinigung des Enzyms wird deshalb der Überstand aus dem Protaminsulfatschritt mit festem Ammoniumsulfat auf einen Sättigungsgrad von o,4 gebracht. Wir verwendeten hierzu einen mechanischen Salzstreuer nach BEISENHERZ et al. (1953). Der dadurch erreichte gleichmäßige Anstieg der Ammoniumsulfatkonzentration bewirkt eine gute Reproduzierbarkeit dieses Fällungsschrittes. Nach 1o Min. Stehen wird abzentrifugiert

(1o Min., 3o ooo × g) und der Niederschlag verworfen. Der Überstand wird auf die gleiche Weise auf einen Sättigungsgrad von o,6 gebracht, abzentrifugiert und der Rückstand in ca. 1oo ml o,1-m. Tris-HCl, pH 7,6 aufgenommen. Die Proteinlösung wird anschließend gegen 3 ltr. eines Puffergemisches, bestehend aus 5 . $1o^{-3}$-m. Tris-HCl, pH 7,6 und $1o^{-3}$ Mol/ltr. Mercaptoäthanol, mindestens 4 Stunden dialysiert. Eine im Dialysat durch ausfallendes Protein hervorgerufene Trübung kann durch anschließende Zentrifugation beseitigt werden. Der Proteingehalt beträgt nach diesem Reinigungsschritt ca. 13 mg/ml.

1.4 Adsorption an $CaPO_4$-Gel

Als weiterer geeigneter Reinigungsschritt erwies sich eine Fraktionierung der Proteinlösung durch positive Adsorption des Enzyms an $CaPO_4$-Gel nach KEILIN und HARTREE (1938). Wie Vorversuche zeigten (vgl. Abb. 15), wird das aktive Protein

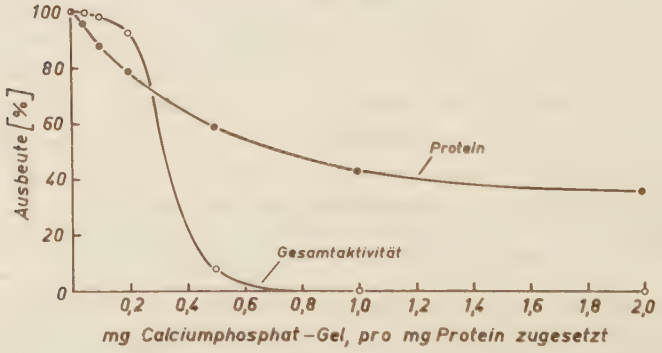

Abb. 15:

Adsorption von Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase an $CaPO_4$-Gel. 6 Teile einer aus dem Ammoniumsulfatschritt stammenden Proteinlösung (Volumen jeweils 4 ml; Proteingehalt 13,6 mg) wurden mit $CaPO_4$-Gel in einem Verhältnis von o,o5; o,1; o,2; o,5; 1,o und 2,o mg Gel (Trockengewicht) pro 1 mg Protein versetzt. Nach Zentrifugieren wurden der Proteingehalt und die Aktivität der Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase im Überstand jeder Probe bestimmt.

schon durch geringe Konzentrationen an zugefügtem Gel quantitativ aus der Lösung entfernt, während fast die Hälfte des Fremdproteins im Überstand verbleibt. Umgekehrt erfolgt die Elution vom Adsorbens bereits bei Anwendung von Phosphatpuffer mit relativ geringer Ionenstärke, so daß ein Teil des Begleitproteins vom Gel nicht mehr abgelöst wird. Frisch bereitetes Gel zeigt im Vergleich mit mehrere Monate gealtertem Gel kein unterschiedliches Verhalten.

Die Reinigung erfolgt im einzelnen auf die im folgenden beschriebene Weise: Zur dialysierten Proteinlösung aus dem Ammoniumsulfatschritt, die auf eine Konzentration von 5 mg/ml verdünnt und gleichzeitig mit 1-m. Trispuffer (pH 7,6) auf eine Molarität von o,o5 gebracht wird, läßt man unter ständigem Rühren soviel $CaPO_4$-Gel zutropfen, daß ein Verhältnis von o,15 mg Gel (Trockengewicht) pro 1 mg Protein erreicht wird. Anschließend wird 5 Min. bei 5 ooo × g zentrifugiert, der Niederschlag verworfen und zum Überstand weiteres $CaPO_4$-Gel zugegeben bis zu einem Verhältnis von o,55 mg pro 1 mg Protein (bezogen auf den ursprünglichen Proteingehalt). Nach Abzentrifugation wird der Rückstand dreimal mit je 2o ml o,o5-m. Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5, der 10^{-3} Mol/ltr. Mercaptoäthanol enthält, 15 Min. lang gerührt und auf diese Weise das aktive Protein vom Gel eluiert. Die durch Zentrifugieren der Suspension erhaltenen Überstände werden vereinigt; sie besitzen einen Proteingehalt von 5-7 mg/ml.

1.5 Erste Chromatographie an TEAE-Cellulose (pH 7,6)

Die weitere Reinigung der Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase erfolgt durch Säulenchromatographie an Ionenaustauschern. In Vorversuchen war ermittelt worden, daß die Anwendung von TEAE-Cellulose die Vorteile guter Abtrennung vom Begleitprotein bei gleichzeitig geringen Aktivitätsverlusten in sich vereinigt.

Da SH-Gruppen tragende Reagenzien stabilisierend auf das hier anzureichernde Enzymsystem wirken, enthielten alle bei der Adsorption und Elution der Proteine verwendeten Puffer einen Zusatz von Mercaptoäthanol in 10^{-3}-m. Konzentration.

Die Reinigung erfolgt im einzelnen auf folgende Weise: sorgfältig von feinen und groben Partikeln befreite TEAE-Cellulose wird mit o,o5-m. Tris-HCl-Puffer, pH 7,o äquilibriert und in eine Säule (Ø 2,5 cm) eingegossen, bis die Höhe der abgesetzten Austauschermasse 15 cm beträgt. Die durch Dialyse in denselben Puffer überführte Proteinlösung aus dem vorhergehenden Reinigungsschritt wird auf die Säule aufgetragen. Nach vollständigem Einsinken in das Gelbett wird mit Äquilibrationspuffer gewaschen, bis ein nachgeschalteter UV-Durchflußanalysator (Wellenlänge 28o mμ) Proteinfreiheit des Eluats anzeigt. Die nachfolgende Elution des adsorbierten Proteins erfolgt mit Hilfe steigender Konzentrationen von KCl in demselben Puffer. Die besten Trennungen konnten bei Anwendung eines konvexen Gradienten erzielt werden. Dazu werden drei hintereinandergeschaltete kugelförmige Gefäße verwendet. Auf das Vorratsgefäß, das 3oo ml einer o,22-m. Lösung von KCl in dem oben angegebenen Startpuffer enthält, folgt das erste Mischgefäß. Dieses ist luftdicht verschlossen, vollständig mit Elutionslösung (16o ml einer o,11-m.KCl-Lösung in demselben Puffer) gefüllt und mit einem Magnetrührer versehen. Das sich anschließende zweite Mischgefäß, dessen Abfluß mit der Chromatographiesäule verbunden ist, zeigt prinzipiell gleichen Aufbau, ist jedoch wesentlich kleiner und enthält lediglich 35 ml des zur Äquilibration verwendeten Puffergemischs. Die Durchflußgeschwindigkeit beträgt ca. 6o ml in der Stunde. Das Eluat wird in einzelnen Fraktionen von je 5 ml Volumen aufgefangen. Nach quantitativer Bestimmung des zu reinigenden Enzyms, das bei etwa o,1-m. KCl-Konzentration die Säule verläßt, werden die aktivsten Fraktionen vereinigt. Auf diese Weise erhält man eine mindestens zwei- bis dreifach gegenüber dem vorhergehenden Reinigungs-

schritt angereicherte, nur noch schwach bräunlich gefärbte Proteinlösung. Ein für die geschilderte Methode typisches Elutionsdiagramm zeigt die Abb. 16.

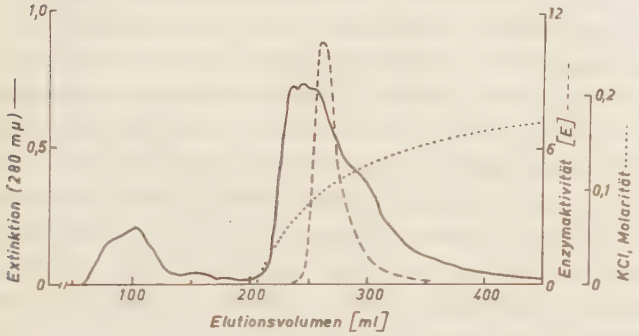

Abb.16:
Chromatographie von Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase an TEAE-Cellulose bei pH 7.6. Nähere Angaben im Text.

1.6 Chromatographie an Hydroxylapatit

Als nächster Reinigungsschritt konnte die Chromatographie der Proteinlösung an einer Hydroxylapatitsäule in das Anreicherungsverfahren aufgenommen werden. Bei dieser Methode werden nur geringe Durchflußgeschwindigkeiten erzielt, dieser Nachteil wird jedoch dadurch wettgemacht, daß sich in den meisten Fällen eine größere Trennschärfe als bei Verwendung von Cellulose-Ionenaustauschern erreichen läßt. Außerdem beobachteten wir stets nur geringe Aktivitätsverluste von wenigen Prozent der eingesetzten Gesamtaktivität. Auch bei diesem Reinigungsschritt war es von Vorteil, allen verwendeten Puffern Mercaptoäthanol in einer Konzentration von 10^{-3} Mol/ltr. zuzusetzen.

Zum Füllen der Chromatographiesäule wird nur Hydroxylapatit verwendet, der durch mindestens dreimaliges Waschen sorgfältigst von feinen Partikeln befreit worden war. Nur so kann eine - an sich schon geringe - Durchflußgeschwindigkeit von wenigstens 15-2o ml in der Stunde erreicht werden. Eine Aufschlämmung von derartig vorbereitetem Hydroxylapatit in $1o^{-3}$-m. Kaliumphosphatpuffer, pH 6,8 wird in eine Säule (Ø 2,5 cm) eingegossen, bis die Höhe des Gelbettes 15 cm beträgt. Die Proteinlösung aus dem vorhergehenden Reinigungsschritt kann ohne Vorbehandlung aufgesetzt werden, da die Adsorptionsfähigkeit von Hydroxylapatit nur durch die Konzentration an Phosphationen beeinflußt wird. Nach Durchwaschen mit Startpuffer zur Entfernung nicht adsorbierter Proteine wird die Säule durch lineare Gradientelution entwickelt. Hierzu werden zwei Gefäße mit gleichen Querschnitten verwendet. Das Vorratsgefäß enthält 2oo ml o,3-m. Kaliumphosphatpuffer, pH 6,8, das mit einem Magnetrührer versehene und mit der Säule verbundene Mischgefäß die gleiche Menge an Startpuffer. Wie Abb. 17 zeigt, wird das aktive Protein schon durch niedrige Phosphationenkonzentrationen (ca. o,o4 Mol/ltr.) vom Adsorbens abgelöst. Die aktivsten Fraktionen (Vol. 5 ml) werden

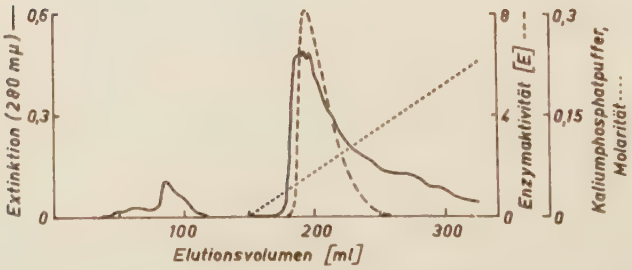

Abb.17:

Chromatographie von Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase an Hydroxylapatit. Einzelheiten im Text.

ereinigt. Auf diese Weise lassen sich mindestens doppelt in zug auf den vorhergehenden Schritt angereicherte Enzympäparationen erzielen.

7 Zweite Chromatographie an TEAE-Cellulose (pH 8.4)

n letzten Schritt der Anreicherung der Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase wird die aus dem vorhergehenden Reinigungsschritt stammende Proteinlösung erneut an TEAE-Cellulose chromatographiert. ie Reinigung erfolgt bei einem stärker basischen pH-Wert von ,4. Das Cellulosepulver wird in o,o5-m.Trispuffer, der Merptoäthanol in 10^{-3}-m. Konzentration enthält, äquilibriert nd in eine Säule mit einem Durchmesser von 1,5 cm bis zu einer öhe von 18 cm eingefüllt. Die gegen denselben Puffer dialysier- e Proteinlösung wird auf die Säule aufgetragen. Nach Auswaschen er nicht adsorbierten Proteine erfolgt die Elution durch einen inearen Gradienten mit steigender KCl-Konzentration. Dieser ird in Analogie zu dem in Abschnitt 1.6 beschriebenen Verahren erzeugt durch kontinuierliches Mischen von je 75 ml quilibrationspuffer und 75 ml einer o,3-m. Lösung von KCl n demselben Puffer. Das Eluat wird in Fraktionen von 2,5 ml olumen aufgefangen. Das Ergebnis eines unter diesen Bedingungen durchgeführten Versuchs zeigt die Abb. 18.

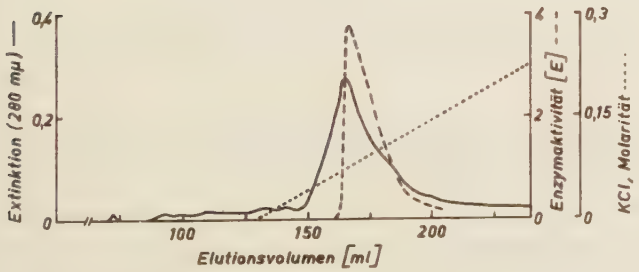

Abb.18:

Chromatographie von Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase an TEAE-Cellulose bei pH 8.4. Nähere Angaben im Test.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse dieses Verahrens, das eine 27o- bis 3oo-fache Anreicherung der Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase ermöglicht, zeigt Tab. 7. Eine Reihe weiterer gebräuchlicher Reinigungsmethoden brachte keinen Erfolg. Durch Chromatographie an DEAE-Sephadex oder Acetonfällungen wurde das Enzym größtenteils oder völlig inaktiviert. Bei Chromatographie an Hydroxylapatit bei pH 7,5 oder Gelfiltration mit Sephadex G 2oo konnte keine Abtrennung inaktiven Proteins erzielt werden.

Schritt	Volumen (ml)	Protein (mg)	Gesamt-Aktivität (mE)	spezifische Aktivität (mE/mg)	Ausbeute (%)
Rohextrakt	492	14 o22	44 8oo	3,2	1oo
Protaminsulfatfällung	142o	6 887	66 ooo	9,6	147
Ammoniumsulfatfraktionierung	122	1 647	54 ooo	32,7	12o
Adsorption an $CaPO_4$-Gel	67	335	46 5oo	138,5	1o4
Chromatographie an TEAE-C, pH 7,6	48	11o,4	37 58o	34o	84
Chromatographie an Hydroxylapatit	38	52,4	36 65o	7oo	81
Chromatographie an TEAE-C, pH 8,4	25,2	27,1	23 4oo	864	52

Tab. 7: Anreicherung von Aryl-Aldehyd : NADP-Oxidoreduktase aus Mycelien von Neurospora crassa.

1.8 Reinheit, Molekulargewicht und Stabilität des Enzympräparates

Die Reinheitsprüfung der in der beschriebenen Weise angereicherten Enzympräparation erfolgte durch analytische Elektrophorese in Polyacrylamid-Gel (vgl. Material und Methoden). Es zeigte sich, daß neben einer Hauptkomponente noch fünf weitere, sehr schwache Banden nachzuweisen sind. Da die im Anreicherungsgang untersuchten und auf einer Vielzahl unterschiedlicher Eigenschaften von Proteinen basierenden Trennungsmethoden zu keiner völligen Reinigung des Enzyms geführt hatten, scheinen die in der Enzympräparation noch enthaltenen geringen Verunreinigungen in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften der Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase so ähnlich zu sein, daß ihre restlose Abtrennung sich äußerst schwierig gestalten dürfte. Auch bei Anreicherungsgängen, die ohne Rücksicht auf die Enzymausbeute lediglich eine möglichst hohe Anreicherung erzielen sollten, wurden nie mehr als 300-fach angereicherte Proteinlösungen erhalten. Die Enzympräparation ist frei von Phosphatase-, Pyrophosphatase- und Myokinaseaktivität. Desweiteren wird eine im Rohextrakt enthaltene Alkohol-Oxidoreduktase großer Aktivität, die den im Enzymtest gebildeten Salicylaldehyd quantitativ zum Alkohol weiterreduziert, bei der Chromatographie an TEAE-Cellulose (pH 7,6) völlig abgetrennt. Wie Abb. 19 zeigt, beweist die chromatographische Analyse des Ätherextraktes eines Enzymtests, daß bei Verwendung von gereinigtem Protein Salicylaldehyd als einziges Reduktionsprodukt auftritt.

Das ungefähre Molekulargewicht des Enzyms wurde durch Gelfiltration an Sephadex G 200 in 0,01-m. Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 ermittelt (ANDREWS 1964). Dazu war eine Säule (Ø 2,5 cm; Höhe des Gelbettes 40 cm) durch Chromatographie verschiedener Proteine bekannten Molekulargewichts und deren anschließende

Bestimmung im Eluat standardisiert worden. Verwendet wurden Cytochrom c aus Pferdeherz, Serumalbumin vom Rind, Fumarase aus Schweineherz, Hefe-Alkohol-Dehydrogenase, Lactat-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus Hefe und Katalase aus Rinderleber. Durch Vergleich mit den auf diese Weise erhaltenen Werten ermittelten wir für die Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase ein Molekulargewicht von ca. 120 000.

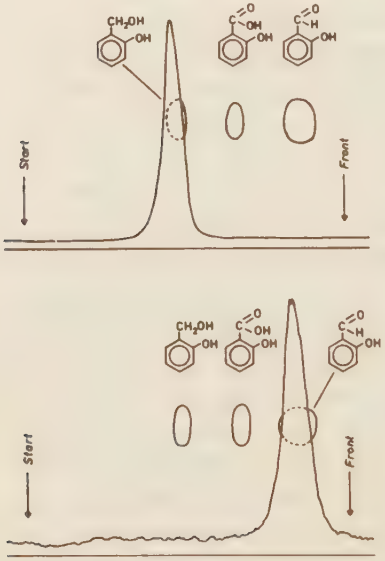

Abb. 19:

Chromatographie des Reduktionsproduktes von Salicylsäure-(-7-^{14}C) bei Verwendung von Rohextrakten (oberer Kurvenzug) und von gereinigtem Enzym (unterer Kurvenzug) im Reaktionsgemisch. Kieselgel GF$_{254}$; Laufmittel Toluol:Äthylformiat:Ameisensäure = 5:4:1.

Das Enzym ist nicht sehr stabil, kann jedoch bei 0° ein bis zwei Wochen ohne größere Aktivitätsverluste aufbewahrt werden. Nach dieser Zeit muß man mit schneller Abnahme der enzymatischen Aktivität rechnen. Zusatz von SH-Gruppen tragenden Reagenzien in 10^{-3}-m. Konzentration, wie z.B. Mercapto-

thanol, verlängert die Beständigkeit des Enzyms um minde-
tens eine Woche. Einfrieren des Enzyms ist zu vermeiden.
ach einmaligem Abkühlen auf -18° und anschließendem Auf-
auen der Proteinlösung in Eiswasser beobachteten wir einen
ktivitätsverlust von 2o %. Offenbar wird die Tertiärstruktur
es Enzyms durch die bei der Eisbildung auftretenden Scheer-
räfte verändert.

2. Eigenschaften der Aryl-Aldehyd:NADP-Oxidoreduktase

2.1 Bestimmung der an der Reaktion beteiligten Coenzyme und Cofaktoren

Zur Klärung der Frage, welche Coenzyme und Cofaktoren bei der Aktivierung und Reduktion aromatischer Säuren durch die Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase beteiligt sind, wurden Proben mit den in Tab. 8 unter System A aufgeführten Reagenzien inkubiert. Ihre Auswertung erfolgte in der unter "Aktivitätsbestimmungen" bereits beschriebenen Weise. In einem weiteren Versuch wurde die Reduktion von Zimtsäure untersucht (System B in Tab. 8). Prinzip des hierfür angewendeten Tests war die photometrische Bestimmung des NADPH-Verbrauchs durch Extinktionsmessung bei 34o mμ. Wie aus der Tabelle hervorgeht, läuft die Reaktion nur bei Gegenwart von ATP ab. Da gleichzeitig die Weglassung von Coenzym A zu keiner Verringerung der enzymatischen Aktivität führt, muß man folgern, daß die Aktivierung der Carboxylgruppe in allein ATP-abhängiger Reaktion erfolgt. Ein Reaktionsmechanismus ähnlich dem der bekannten Aktivierung von Fettsäuren, bei dem die Bildung der energiereichen CoA-Ester über ein intermediäres Acyl-AMP-Derivat erfolgt, ist demnach ausgeschlossen (siehe auch Abschnitt 2.8). Es ist bekannt, daß eine Vielzahl von ATP-umsetzenden Enzymen durch die Anwesenheit von Mg^{2+}-Ionen in ihrer Aktivität gesteigert wird. Man nimmt an, daß die Reaktion aus einem Mg^{2+}-ATP-Komplex heraus erfolgt. Auch im Falle der von uns untersuchten, unter ATP-Verbrauch verlaufenden Reaktion bewirkte die Zugabe von $MgCl_2$ zum Testansatz eine Erhöhung der Umsatzrate.

Die Reduktion der Carboxylgruppe gelingt nur bei Verwendung von ATP. Wurde dieses Coenzym durch die Nucleosidtriphosphate CTP, GTP oder UTP ersetzt, so blieb das Enzym inaktiv. Lediglich mit ITP ließ sich eine geringe Reduktionswirkung von nur 5,4 % des mit ATP erhaltenen Vergleichswertes erzielen.

	System A		System B	
	Salicylaldehyd gebildet (mµMol)	relative Enzymaktivität (%)	Reaktionsgeschwindigkeit (mµMol/Min)	relative Enzymaktivität (%)
Komplettes System	18o	1oo	11,3	1oo
" - $MgCl_2$	89	5o	7,9	7o
" - R-SH	15	8	4,o	35
" - CoA-SH	18o	1oo	11,3	1oo
" + NADH, - NADPH	22	15	o	o
" - NADPH	o	o	-	-
" - ATP	o	o	o	o
" mit hitzedenaturiertem Protein	o	o	o	o

Tab.8: Bestimmung der Coenzyme und Cofaktoren der Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase.
System A: 1oo µMol Tris-HCl, pH 8,o; 1o µMol $MgCl_2$; 5 µMol L-Cystein; 2 µMol = o,1 µC Salicylsäure-(-7-^{14}C); o,2 µMol CoA; 1o µMol ATP; o,7 µMol NAD(P)H; o,o3 mg Protein (spezifische Aktivität 2oo mE/mg); Gesamtvolumen 1 ml; Inkubationszeit 3o Min. bei 3o°.
System B: 2oo µMol Tris-HCl, pH 8,o; 2o µMol $MgCl_2$; 4 µMol Dithiothreitol; 4 µMol Zimtsäure; 1 µMol NAD(P)H; 4 µMol ATP; o,4 µMol CoA; o,o25 mg Protein (spezifische Aktivität 45o mE/mg); Gesamtvolumen 2 ml; Temperatur 3o°; Meßstrahlung 34o mµ; d = 1 cm.

Als Donator für den zur Reduktion benötigten Wasserstoff fungiert offensichtlich NADPH. Die geringe Bildung von Salicylaldehyd, die sich bei Verwendung von NADH anstelle von NADPH in System A nachweisen läßt, ist darauf zurückzuführen, daß in

diesem Falle eine Enzympräparation geringeren Reinheitsgrades verwendet wurde. Die in System B eingesetzte hochgereinigte Enzymlösung zeigt keine Aktivität mehr mit diesem Coenzym. Dieses Ergebnis paßt gut zu der bekannten Tatsache, daß NADH meist seinen Wasserstoff an die Enzyme der Atmungskette weitergibt, während NADPH allgemein bei synthetischen Prozessen als Donator von Reduktionsäquivalenten dient.

Wie aus Tab. 8 weiter hervorgeht, verursacht das Fehlen von SH-Gruppen tragenden Reagenzien im Enzymtest einen signifikanten Aktivitätsverlust. Die Tatsache, daß Sulfhydrylgruppen als Cofaktoren wirken, ist auch von anderen Enzymen her bekannt. Als Beispiel seien die verschiedenen 3-Phospho-Glycerinaldehyd-Dehydrogenasen genannt, die alle durch Zusatz von SH-Gruppen aktiviert werden. Durch diese Reagenzien werden die empfindlichen, reaktiven SH-Gruppen im Enzymmolekül vor Oxidation zu Disulfiden bewahrt. Diese Schutzwirkung erklärt auch, warum sich das Fehlen von SH-Gruppen im Enzymansatz bei der 30 Min. dauernden Inkubation des Systems A wesentlich stärker auswirkt als im Falle der in wenigen Minuten durchzuführenden Messung der Reaktionsgeschwindigkeit bei System B.

Die Bedeutung dieser Reagenzien veranlaßte uns, eine Reihe gebräuchlicher Sulfhydryl-Verbindungen auf ihre Wirksamkeit im Enzymtest hin zu untersuchen. Wie aus den in Tab. 9 zusammengefaßten Ergebnissen hervorgeht, verläuft die Reduktion von Salicylsäure am schnellsten bei Gegenwart von Dithiothreitol. Dies ist darauf zurückzuführen, daß dieses von CLELAND 1964 erstmals verwendete Reagens offenbar nicht nur die Oxidation von SH-Gruppen wirksam verhindert, sondern auch bereits entstandene Disulfidbrücken auf schonendste Weise wieder reduziert (vgl. z.B. CRAWHALL und SEGAL, 1966; CHILSON et al., 1966). Die Tatsache, daß die ebenfalls untersuchten optischen Antipoden D- und L-Cystein im Enzymtest keinen Unterschied in ihrer Wirksamkeit zeigen, kann als weiterer Beweis dafür

gelten, daß die SH-Reagenzien rein physikalisch-chemisch als Antioxidantien wirken. Sollten sie nämlich direkt an der Enzymreaktion beteiligt sein, wäre bei der bekannten Stereospezifität derartiger Reaktionen die bevorzugte Umsetzung von nur einem der beiden Isomeren (am wahrscheinlichsten der L-Form) zu erwarten.

zugesetztes SH-Reagens	mµMol Salicylaldehyd gebildet bei einer SH-Konzentration von 5.10^{-4} Mol/ltr	5.10^{-3} Mol/ltr
L-Cystein	44	74
D-Cystein	46	82
Glutathion, reduz.	20	38
Mercaptoäthanol	-	62
Dithiothreitol (Cleland-Reagens)	93	126
Kontrolle (ohne Zusatz)	19	

Tab. 9: Einfluß verschiedener SH-Reagenzien auf die enzymatische Reduktion von Salicylsäure zu Salicylaldehyd. Die Ansätze enthielten in einem Gesamtvolumen von 1 ml: 100 µMol Tris-HCl, pH 8,0; 10 µMol $MgCl_2$; 2 µMol = 0,1 µC Salicylsäure-(-7-^{14}C); 2 µMol ATP; 0,35 µMol NADPH; 0,09 mg Protein. Inkubation 30 Min. bei 30°.

2.2 Kinetik der Reaktion

Die Kinetik der unter ATP- und NADPH-Verbrauch ablaufenden enzymatischen Reduktion von Salicylsäure zu Salicylaldehyd ist in Abb. 20 dargestellt. Die Reaktion verläuft linear über einen Zeitraum von 1 Stunde; erst bei längerer Reaktionsdauer ist die Proportionalität zwischen Inkubationszeit und gebildeter Menge an Salicylaldehyd durch Verbrauch der Substrate nicht mehr gewahrt.

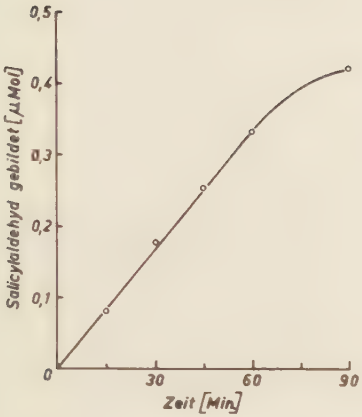

Abb. 2o:
Kinetik der Reduktion von Salicylsäure zu Salicylaldehyd. Ansatz: vgl. Angaben zu Tab.9; jedoch 45 µg Protein; Inkubationszeit variiert von 15 bis 9o Min.

2.3 Abhängigkeit der Reaktion von der Enzymkonzentration

Wie aus Abb. 21 hervorgeht, steigt die Reaktionsgeschwindigkeit proportional zur eingesetzten Proteinmenge in einem untersuchten Bereich von 1ß-9o µg/ml Testansatz an. Die Linearität der Abhängigkeit zeigt, daß in der Enzympräparation kein hemmender Bestandteil enthalten ist, da sich in einem solchen Falle ein exponentieller Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit ergeben müßte.

2.4 pH-Abhängigkeit der Reaktion

Der optimale Wirkungsbereich der Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase liegt bei pH 7,7-8,1 (Tris-HCl-Puffer). Sowohl bei höheren, als auch bei niedrigeren H^+-Ionenkonzentrationen fällt die Reaktionsgeschwindigkeit des Enzymsystems sehr rasch ab. Die graphische Darstellung der pH-Abhängigkeit zeigt Abb.22.

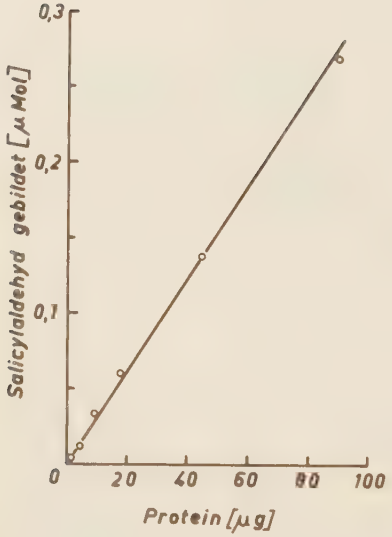

Abb. 21:

Abhängigkeit der Reduktion von Salicylsäure von der Enzymkonzentration. Reaktionszeit 3o Min. bei 3o°. Bedingungen wie in Tab.9 angegeben, aber mit verschiedenen Enzymmengen.

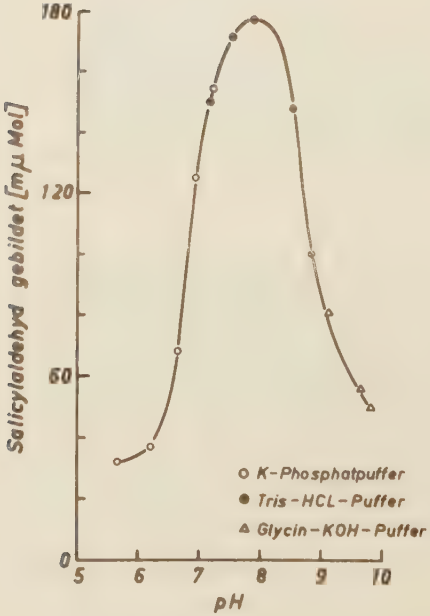

Abb. 22:

Abhängigkeit der enzymatischen Reduktion von Salicylsäure zu Salicylaldehyd vom pH-Wert. Reaktionsansatz: loo µMol Puffer; lo µMol $MgCl_2$; 5 µMol L-Cystein; 2 µMol = o,1 µC Salicylsäure-(-7-^{14}C); lo µMol ATP; o,35 µMol NADPH; o,o3 mg Protein; Gesamtvolumen 1 ml; Inkubation 3o Min. bei 3o°.

2.5 Abhängigkeit der Reaktonsgeschwindigkeit von den Substratkonzentrationen

Die Geschwindigkeit enzymatischer Reaktionen wird in hohem Maße durch die gewählte Substratkonzentration beeinflußt. Erhöhung der Konzentration führt zu einer Steigerung der Umsatzrate bis zu einem bestimmten Sättigungswert, von dem ab keine Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit mehr möglich ist. In vielen Fällen führt ein großer Überschuß an Substrat wieder umgekehrt zu einer Hemmung der enzymatischen Reaktion. Aus diesen Gründen ist die Bestimmung der optimalen Substratkonzentrationen von großer praktischer Bedeutung für die Charakterisierung eines Enzymsystems.

In Abb. 23 ist die Abhängigkeit der Salicylaldehydbildung von der eingesetzten Menge an Salicylsäure dargestellt.

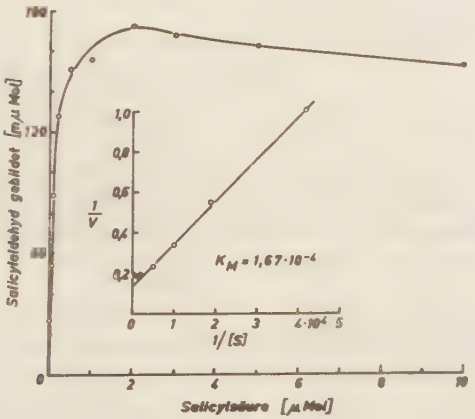

Abb. 23:

Abhängigkeit der Reaktonsgeschwindigkeit von der Salicylsäurekonzentration. Reaktionsansatz (1 ml): 1oo µMol Tris-HCl, pH 8,o; 1o µMol $MgCl_2$; 5 µMol L-Cystein; 2 µMol ATP; o,35 µMol NADPH; o,o3 mg Protein; steigende Mengen (o,o2-1o µMol) Salicylsäure-(-7-^{14}C) = o,1 µC; Inkubation 3o Min. bei 3o°.

Das Optimum liegt bei 2 µMol/ml Testansatz; höhere Konzentrationen führen zu deutlicher Substrathemmung. Die Michaeliskonstante wurde durch graphische Darstellung nach LINEWEAVER und BURK (1934) ermittelt; als Dissoziationskonstante des Enzymsubstratkomplexes ergab sich ein K_m-Wert von 1,67 . 10^{-4} Mol/ltr. Eine noch ausgeprägtere Hemmung bei Anwendung hoher Substratkonzentrationen zeigt das reduzierende Coenzym NADPH. Maximale Reaktionsgeschwindigkeit wird bei einer Konzentration von 3 . 10^{-4} Mol/ltr. erreicht. Die Michaeliskonstante ließ sich nicht bestimmen, da sich bei graphischer Auswertung keine Gerade ergibt (Abb. 24). Der

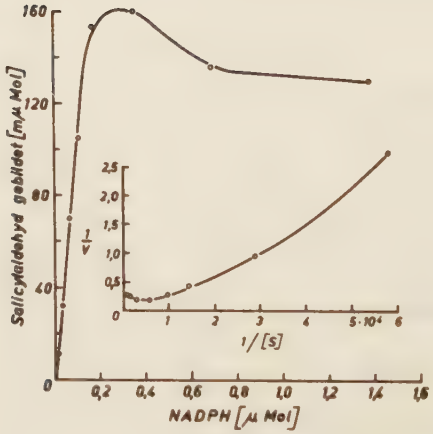

Abb. 24:

Einfluß der NADPH-Konzentration auf die Geschwindigkeit der enzymatischen Reduktion von Salicylsäure zum Aldehyd. Reaktionsbedingungen wie bei Abb. 23 angegeben, jedoch 2 µMol Salicylsäure.

Kurvenverlauf spricht für die Annahme, daß das Substrat NADPH bei geringen Konzentrationen auch als Aktivator auf das Enzymsystem wirkt. Da andererseits bei hohen Substrat-

konzentrationen aber Hemmung eintritt, ist auch die ungefähre Bestimmung des K_m-Wertes durch Anlegen der Tangente im Schnittpunkt der Kurve mit der Ordinate 1/V unmöglich. Für ATP wurde die Michaeliskonstante zu 1,52 . 10^{-4} Mol/ltr. bestimmt; Substratsättigung wird bei 5 . 10^{-4}-m. Konzentration erreicht (Abb. 25). Die Variation der Mg^{2+}-Ionenkon-

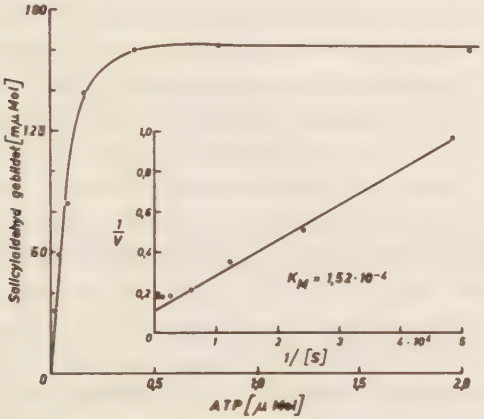

Abb. 25:

Abhängigkeit der Geschwindigkeit der enzymatischen Reduktion von Salicylsäure von der ATP-Konzentration. Reaktionsbedingungen wie bei Abb. 23 angegeben.

zentration in einem Bereich von 1-2o µMol/ml Testansatz führte zu keiner Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit. Der Einfluß der Konzentration von SH-Reagenzien auf die Reaktion wurde am Beispiel von L-Cystein näher untersucht. Wie Abb. 26 zeigt, liegt das Optimum bei 2-5.10^{-3} Mol/ltr. Höhere Konzentrationen führen auch hier wieder durch Substrathemmung zu einer Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit.

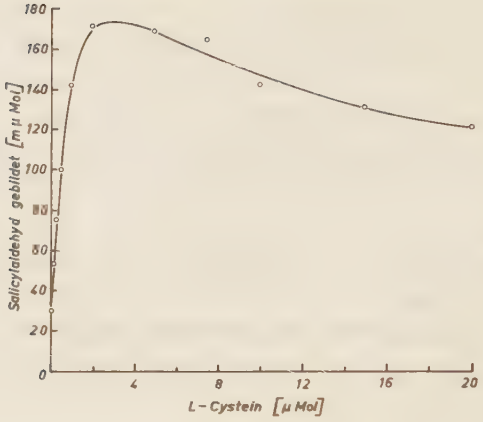

Abb. 26:

Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration an L-Cystein im Enzymtest. Reaktionsbedingungen wie bei Abb. 23 angegeben.

2.6 Temperaturabhängigkeit der Reaktion

Der Temperaturbereich, bei dem die enzymatische Reduktion von Salicylsäure mit maximaler Geschwindigkeit erfolgt, liegt bei 35 - 36 ° (Abb. 27). Bei höheren Tempe-

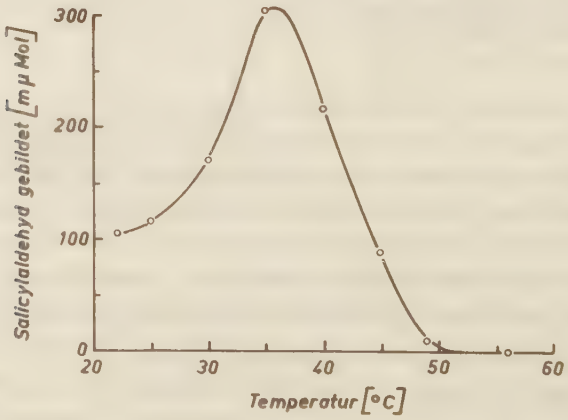

Abb.27:

Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Reduktion von Salicylsäure zu Salicylaldehyd. Reaktionsbedingungen wie bei Abb. 23 angegeben.

raturen nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit stark ab; über 50° ist keine Bildung von Salicylaldehyd mehr zu beobachten. Das beschriebene Enzymsystem zeigt demnach relativ große Labilität gegenüber thermischen Einflüßen.

2.7 Substratspezifität der Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase

Die Ermittlung der relativen Aktivität der verschiedenen untersuchten Substrate konnte nicht in der für Salicylsäure beschriebenen Weise durchgeführt werden. Für diese Testmethode wäre es nötig gewesen, alle Säuren in radioaktiv markierter Form zu besitzen. Desweiteren hätte die sich bei Ätherextraktion des Inkubationsgemischs ergebende Aldehydausbeute für jedes Substrat einzeln bestimmt werden müssen. Auch die photometrische Bestimmung der NADPH-Abnahme durch Extinktionsmessung bei 340 mμ war nicht möglich, da viele der zu untersuchenden Substrate in diesem Bereich des kurzwelligen Lichts stark absorbieren. Die relative Umsatzgeschwindigkeit der verschiedenen Säuren wurde deshalb durch Bestimmung der im Laufe der Reaktion im Enzymansatz verbrauchten ATP-Menge ermittelt. Dazu wurden die Proben durch Zugabe von 0,2 ml 3-m. Perchlorsäure enteiweißt und anschließend durch Titration mit 3-m. KOH (Indikator Methylorange) wieder neutralisiert. An einem Aliquot wurde dann auf enzymatischem Wege der Gehalt an ATP bestimmt; die angewendete Testmethode ist im experimentellen Teil aufgeführt.

Die auf diese Weise erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 10 zusammengestellt. Wie daraus hervorgeht, zeigt das Enzymsystem geringe Substratspezifität. Seine Aktivität scheint jedoch auf Säuren mit aromatischen Resten beschränkt zu sein; bei den untersuchten aliphatischen Verbindungen Essigsäure und L-Alanin ließ sich keine Reduktionswirkung nachweisen. Wie bei der schon beschriebenen Aktivierung von Zimtsäure durch Acyl-CoA-Ligase zeigen sich auch hier gewisse, dem Substitutionsmuster der Säure entsprechende

Phenylcarbonsäuren	relative Enzymaktivität (%)	Phenylacrylsäuren	relative Enzymaktivität (%)
Benzoesäure	286	Zimtsäure	229
Salicylsäure	1oo	o-Cumarsäure	141
m-Hydroxybenzoesäure	15o	m-Cumarsäure	97
p-Hydroxybenzoesäure	135	p-Cumarsäure	48
Anissäure	195	p-Methoxyzimtsäure	66
Protocatechusäure	91	Kaffesäure	34
Vanillinsäure	15o	Ferulasäure	7
-	-	Isoferulasäure	2o
Veratrumsäure	18o	3.4-Dimethoxy-zimtsäure	2o
-	-	3.4-Methylendioxy-zimtsäure	12o
Syringasäure	7	Sinapinsäure	17
3.4.5-Trimethoxy-benzoesäure	18	3.4.5-Trimethoxy-zimtsäure	o
sonstige untersuchte Verbindungen			
Essigsäure	o	Phenylessigsäure	38
L-Alanin	o	α-Naphthylessigsäure	31

Tab.1o: Substratspezifität der Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase. Die Zahlen geben die relative Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion an, bezogen auf Salicylsäure = 1oo %. Alle Säuren wurden in einer Konzentration von 2 µMol/ml im Reaktionsansatz getestet. Inkubationszeit 3o Min. bei 3o°. Ansatz mit Isocitratdehydrogenase-Hilfssystem wie unter Aktivitätsbestimmung (Abschnitt C 1.2.1) beschrieben.

Regelmäßigkeiten. Die unsubstituierten Verbindungen Benzoesäure und Zimtsäure sind unter den angegebenen Bedingungen die reaktivsten Substrate. Eine zunehmende Zahl an Kernsubstituenten

bringt wachsende Hemmung des Enzyms mit sich. Mono- und disubstituierte Säuren reagieren bereits wesentlich langsamer, trisubstituierte Säuren werden nicht mehr oder nur in geringem Maße umgesetzt. Phenolische OH-Gruppen - besonders solche in p-Stellung - zeigen auch hier stärkere Hemmwirkung als Methoxylgruppen. So nimmt z.B. die Reaktionsgeschwindigkeit in der Reihe Protocatechusäure - Vanillinsäure - Veratrumsäure mit steigendem Methylierungsgrad der OH-Gruppen beträchtlich zu. Eine - wenn auch geringe - Reduktionswirkung des Enzymsystems ließ sich bei Verwendung von Phenylessigsäure und α-Naphthylessigsäure als Substraten beobachten.

2.8 Stöchiometrie der Reaktion

Einer der wichtigsten Punkte zur Charakterisierung des Enzymsystems war die Ermittlung der Reaktionsstöchiometrie. In einem ersten Versuch wurden Ansätze inkubiert, die neben den sonstigen Reagenzien genau bestimmte Mengen an ATP, bzw. NADPH und Enzym im Überschuß enthielten. Nach vollständiger Umsetzung der Coenzyme wurde der gebildete Salicylaldehyd quantitativ bestimmt. Es zeigte sich, daß in beiden Versuchsreihen die Aldehydmenge direkt proportional zur eingesetzten Menge an ATP, bzw. NADPH war (Abb. 28). Dieses Ergebnis beweist, daß Salicylsäure und die beiden Coenzyme in äquimolaren Mengenverhältnissen miteinander reagieren. Zur Aktivierung und Reduktion einer Carboxylgruppe reichen also je ein Molekül ATP und NADPH aus; dies ist auch auf Grund chemischer Überlegungen zu erwarten. Analog mit Zimtsäure als Substrat durchgeführte Versuche erbrachten das gleiche Ergebnis.

Weitere Versuche sollten vor allem klären, in welche Produkte das energieliefernde Coenzym ATP bei der Aktivierung der Carboxylgruppe gespalten wird. Dazu wurden an Proben, die in der im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Weise

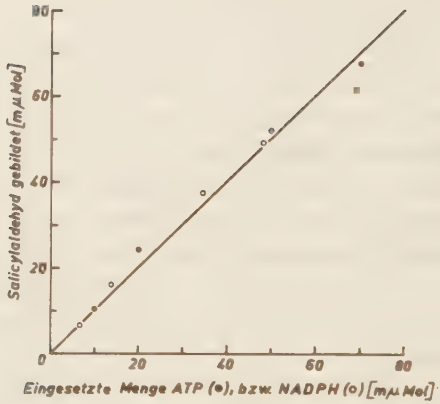

Abb. 28:

Reduktion von Salicylsäure bei vollständiger Umsetzung bekannter Mengen an ATP, bzw. NADPH. Reaktionsansätze wie unter Aktivitätsbestimmungen beschrieben; eingesetztes ATP 10-70 mμMol; NADPH 6,9-69 mμMol. Inkubation 4 Stdn. bei 35°.

enteiweißt worden waren, der ATP-Verbrauch und die Konzentrationen an gebildetem ADP, AMP, Pyrophosphat und Orthophosphat ermittelt. Die hierbei verwendeten Bestimmungsmethoden sind im experimentellen Teil angegeben. Als Blindwert diente eine Probe ohne reduzierendes Coenzym. Wie ein Vergleich mit Tab. 11 zeigt, wird ATP im Verlauf der Enzymreaktion in ADP und Phosphat gespalten. Dies gilt auch, wenn Zimtsäure anstelle von Salicylsäure eingesetzt wird. Die graphische Darstellung einer enzymatischen Bestimmung von ADP und AMP aus dem Reaktionsgemisch zeigt Abb. 29.

Daß ADP und nicht AMP im Verlauf der Reaktion freigesetzt wird, konnte auch auf chromatographischem Wege gezeigt werden. Dazu wurden Proben, die Zimtsäure als Substrat enthielten, nach Reaktionsende auf Whatman-3-Papier aufgetragen und aufsteigend chromatographiert. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus Isobuttersäure (100 ml), 1-m. Ammoniaklösung (60 ml) und 0,1-m. Na_2-Versen (1,6 ml; KREBS und HEMS, 1953). Die Lokalisierung und Identifizierung der Phosphatester erfolgte nach HANES und ISHERWOOD (1949). Auch auf diese Weise war nur

	mµMol
Salicylaldehyd gebildet	23o
ATP verbraucht	26o
ADP gebildet	23o
AMP gebildet	4o
Pyrophosphat gebildet	4o
Orthophosphat gebildet	28o

Tab.11: Stöchiometrie der Salicylsäurereduktion. Reaktionsansatz: 1oo µMol Tris-HCl, pH 7,6; 2o µMol $MgCl_2$; 2 µMol Dithiothreitol; 2 µMol = o,1 µC Salicylsäure-(-7-^{14}C); o,1 µMol NADP; 4 µMol DL-Isocitrat; o,o5 mg Isocitrat-Dehydrogenase; 1 µMol ATP; o,o4 mg Enzym. Gesamtvolumen 1 ml. Inkubationszeit 6o Min. bei 35°.

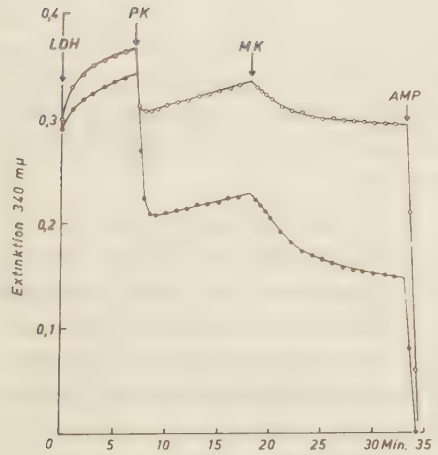

Abb. 29:

Bestimmung des bei der enzymatischen Reduktion von Salicylsäure entstandenen ADP und AMP im optischen Test. Zur Bestimmung gelangte ein Aliquot aus den nach Reaktionsende entproteinisierten Proben. Analysiert wurden ein vollständiger Ansatz (•) und eine Vergleichsprobe ohne NADPH (o). Einzelheiten sind im experimentellen Teil beschrieben.

ADP (R_f o,38) neben unverbrauchtem ATP (R_f o,3o) nachzuweisen; von AMP (R_f o,52) wurden nur geringste, kaum eine Farbreaktion mehr zeigende Spuren gefunden.

Trotz Anwendung von Hydroxylamin in Konzentrationen bis zu 1-m. Lösung gelang es nicht, die Existenz eines freien aktivierten Intermediärproduktes nachzuweisen. Dazu ist zu bemerken, daß Hydroxylamin die Reaktion zwar hemmt (bei 1-m. NH_2OH ermittelten wir eine Restaktivität von 22 % des Vergleichswertes), die im Enzymtest erzielten Umsätze jedoch stets zur sicheren Aktivitätsbestimmung ausreichend waren. Auch in Versuchen, bei denen Benzoylphosphat unter Weglassung von ATP in den Enzymtest eingesetzt wurde, konnte keine Reduktion nachgewiesen werden. Es ist somit weitgehend ausgeschlossen, daß die Reaktion über ein freies Acylphosphat verläuft. Der Weg über ein Säure-ADP-Derivat erscheint von vornherein unwahrscheinlich. Durchaus möglich erscheint jedoch die Annahme, daß Aktivierung und Reduktion der Carboxylgruppe enzymgebunden verlaufen.

Auch für eine eventuelle Rückreaktion oder die Ausbildung eines Gleichgewichts im Enzymtest hatten sich keine Anhaltspunkte ergeben. Auf Grund der beschriebenen Ergebnisse stellen wir deshalb für die enzymatische Reduktion aromatischer Säuren die folgende Reaktionsgleichung auf :

$$\text{Ar-COOH} + \text{ATP} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \xrightarrow[(Mg^{2+},\ \text{R-SH})]{} \text{Ar-CHO} + \text{ADP} + \text{NADP}^+ + PO_4^{3-} + H_2O$$

Als systematischen Namen für das Enzym schlagen wir die Bezeichnung Aryl-Aldehyd:NADP-Oxidoreduktase (ADP) vor (Enzymverzeichnis Gruppe 1.2.1)

E. Reinigung und Eigenschaften von Aryl-Alkohol:NADP-Oxidoreduktase aus Neurospora crassa

1. Reinigung des Enzyms

1.1 Aufschluß der Mycelien und Fällung mit Protaminsulfat

Als Enzymquelle dienen 6o g derselben Mycelien von Neurospora crassa, wie sie auch zur Gewinnung der Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase verwendet werden. Rohextrakte daraus werden auf die schon für das Reinigungsverfahren dieses Enzyms beschriebene Weise erhalten. Alle Arbeitsgänge werden bei Temperaturen von +1 - +4° durchgeführt.

Wie im Falle des im vorhergehenden Kapitels beschriebenen Anreicherungsverfahrens erwies sich auch zur Reinigung der Aryl-Alkohol-Oxidoreduktase ein erster Fällungsschritt mit Protaminsulfat als sehr vorteilhaft. Wie die Untersuchung der Fällung zeigt (Abb. 3o), gelingt es auch bei Zugabe großer Mengen an Protaminsulfat nicht, das Enzym aus der Proteinlösung zu entfernen. Die auch in diesem Falle loo % übersteigende Ausbeute an Gesamtaktivität muß auf die Abtrennung eines hemmenden Bestandteils des Rohextraktes zurückgeführt werden.

Im einzelnen ist der erste Reinigungsschritt in folgender Weise auszuführen: Zu dem auf eine Proteinkonzentration von lo mg/ml verdünnten Rohextrakt läßt man unter Rühren 2 %ige Protaminsulfatlösung zutropfen (o,75 ml pro loo mg Protein). Nach lo Min. Rühren wird der Niederschlag abzentrifugiert (15 Min., 3o ooo × g) und verworfen. Der Überstand enthält das Enzym zwei- bis dreifach angereichert, seine Proteinkonzentration beträgt ungefähr 4 mg/ml.

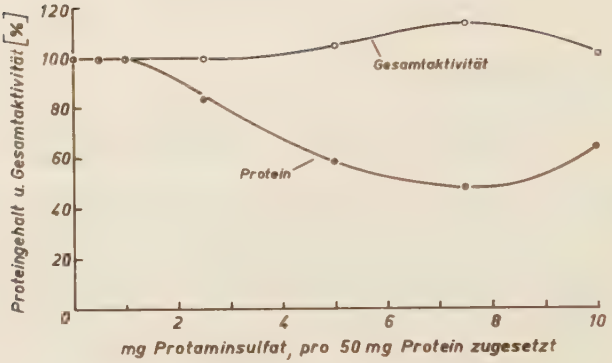

Abb.3o:

Abhängigkeit der Proteinfällung im Rohextrakt von der Protaminsulfatkonzentration. Sechs Teilen eines Rohextrakts (Volumen jeweils 5 ml = 5o mg Protein) wurden o,5; 1,o; 2,5; 5,o; 7,5 und 1o,o mg Protaminsulfat zugesetzt. Nach Abzentrifugieren der Niederschläge wurden im Überstand jeder Probe der Proteingehalt und die Aktivität der Aryl-Alkohol-Oxidoreduktase bestimmt.

1.2 Fraktionierung mit Ammoniumsulfat

Als zweiter Reinigungsschritt schließt sich eine Fraktionierung der Enzymlösung mit festem Ammoniumsulfat an. In einem Vorversuch wurde stufenweise die Ammoniumsulfatkonzentration der Proteinlösung erhöht und der erhaltene Niederschlag jeweils abzentrifugiert. Nach Aufnehmen in verdünntem Trispuffer und anschließender Dialyse wurde die Aktivität der einzelnen Fraktionen bestimmt. Wie Abb. 31 zeigt, fällt das Enzym in einem Sättigungsbereich von o,4 - o,6. Zur Erzielung einer guten Reinigung wurde deshalb die Fraktionierung der Enzymlösung bei Ammoniumsulfatsättigung o,45 - o,6o für günstig befunden.

Zur Durchführung des zweiten Reinigungsschrittes wird der Überstand der Protaminsulfatfällung mit festem Ammoniumsulfat auf Sättigung o,45 gebracht. Nach lo Min. Stehen wird zentrifugiert (lo Min., 3o ooo × g) und der Überstand anschließend weiter auf Sättigung o,6 gebracht. Der durch Zentrifugieren erhaltene Niederschlag dieser Fraktion wird in wenig o,o5-m. Tris-HCl-Puffer, pH 7,6 aufgenommen und gegen 2 ltr. 5.10^{-3}-m. Trispuffer dialysiert. Es ist vorteilhaft, dem Dialysepuffer zur Stabilisierung des Enzyms Mercaptoäthanol in 10^{-3}-m. Konzentration zuzusetzen. Auf diese Weise wird ein ungefähr 9-fach in Bezug auf den Rohextrakt angereichertes Enzympräparat erhalten.

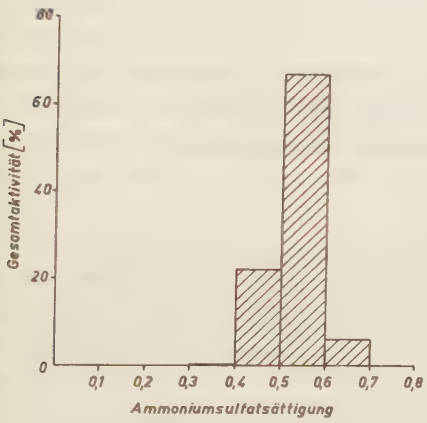

Abb. 31:
Stufenweise Fraktionierung von Aryl-Alkohol-Oxidoreduktase mit Ammoniumsulfat. Nähere Angaben im Text.

1.3 Adsorption an $CaPO_4$-Gel

Zur weiteren Reinigung der Aryl-Alkohol-Oxidoreduktase erwies sich Adsorption des aktiven Proteins an $CaPO_4$-Gel nach KEILIN und HARTREE (1938) und anschließende Elution als sehr vorteilhaft. Vorversuche, deren Ergebnisse in Abb. 32 graphisch

dargestellt sind, hatten ergeben, daß das anzureichernde Enzymprotein erst bei Zugabe relativ großer Gelmengen gebunden wird. Gleichzeitig wird ein Großteil der Verunreinigungen schon vor Ausfällung des aktiven Proteins aus der Lösung abgetrennt.

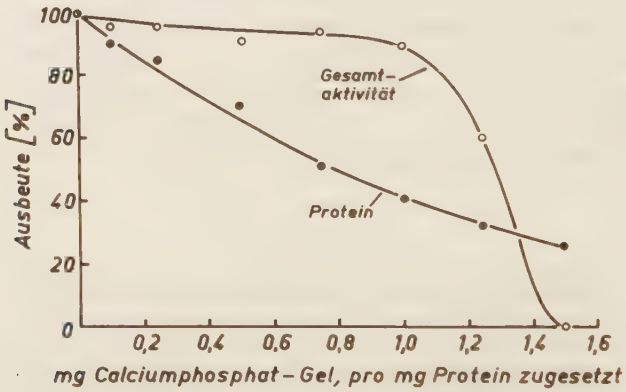

Abb.32:

Adsorption der Aryl-Alkohol-Oxidoreduktase an $CaPO_4$-Gel. 4 ml Proteinlösung (1o mg Protein) wurden stufenweise mit den angegebenen Gelmengen versetzt. Nach Zentrifugieren wurden der Proteingehalt und die Enzymaktivität im Überstand jedes Fällungsschrittes bestimmt.

Vor Ausführung des Reinigungsschrittes wird die durch Fraktionierung mit Ammoniumsulfat erhaltene Proteinlösung auf eine Konzentration von 5 mg/ml verdünnt und gleichzeitig die Pufferkonzentration auf eine Molarität von o,o5 gebracht. Zur Entfernung der Begleitproteine läßt man in einer ersten Fällung unter ständigem Rühren soviel Gelsuspension zutropfen, daß ein Verhältnis von o,8 mg Gel (Trockengewicht) pro 1 mg Protein erreicht wird. Nach Abzentrifugieren (1o Min., 5 ooo × g) und Verwerfen des Niederschlags wird weiteres

$CaPO_4$-Gel zugegeben bis zu einem Verhältnis von 1,8 mg Gel pro 1 mg Protein, bezogen auf den Proteingehalt der Ausgangslösung. Nach Abzentrifugieren wird das am Niederschlag adsorbierte Protein durch dreimaliges Waschen von jeweils 15 Min. Dauer mit je 2o ml. o,o5-m. Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 eluiert. Die durch Zentrifugieren der Suspension erhaltenen Überstände werden vereinigt; in ihnen ist das Enzym ungefähr vierfach gegenüber dem vorhergehenden Reinigungsschritt angereichert.

1.4 Gelfiltration an Sephadex G 2oo

Als weiterer Schritt konnte die Gelfiltration der Enzymlösung an Sephadex G 2oo in das Reinigungsverfahren aufgenommen werden. Prinzip der Trennungsmethode ist die Tatsache, daß Proteine verschiedenen Molekulargewichts in einem locker vernetzten Dextrangel bestimmter Porengröße unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten zeigen. Es gilt, daß mit abnehmendem Molekulargewicht die Durchtrittsgeschwindigkeit durch das Gel verringert wird (DETERMANN, 1964).

Vor der Durchführung des Reinigungsschrittes muß die Proteinlösung konzentriert werden. Diese wird dazu mit festem Ammoniumsulfat auf Sättigung o,7 gebracht, wodurch die Gesamtheit des Proteins ausgefällt wird. Der durch Zentrifugieren abgetrennte Niederschlag wird anschließend in maximal 3-4 ml o,o1-m. Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5, der o,1 Mol/ltr. KCl und 10^{-3} Mol/ltr. Mercaptoäthanol enthält aufgenommen. In demselben Puffergemisch gequollenes Sephadex-Gel G 2oo wird in eine Chromatographiesäule (Ø 2,5 cm) eingefüllt, bis die Höhe des Gelbettes 4o cm beträgt. Die zu reinigende Probe, die zur Erzielung einer größeren Dichte mit 2 % Glucose versetzt ist, wird durch vorsichtiges unterschichten der über der Säulenfüllung stehenden Pufferlösung auf das Gel aufgetragen. Die Chromatographie erfolgt durch Elution mit Äquili-

brationspuffer bei einem hydrostatischen Druck von ca. 4o g/cm^2. Das Eluat wird in Fraktionen von 2,5 ml Volumen aufgefangen. Nach Bestimmung der enzymatischen Aktivität der einzelnen Proben werden die aktivsten Fraktionen vereinigt. Auf diese Weise läßt sich das Enzym um mehr als das Doppelte anreichern.

1.5 Chromatographie an DEAE-Cellulose

In einem abschließenden Reinigungsschritt durch Chromatographie der Proteine an DEAE-Cellulose wird der größte Teil des noch vorhandenen Begleitproteins vom Enzym abgetrennt. Die Spitzenfraktionen sind im Vergleich zu Rohextrakten mehr als 6oo-fach angereichert. Vereinigt man die aktivsten Fraktionen, erhält man ein immer noch über 45o-fach angereichertes Enzympräparat.

Zur Durchführung der Chromatographie wird DEAE-Cellulose in o,o5-m. Tris-HCl-Puffer, pH 7,6 äquilibriert und in eine Säule (Ø 2,5 cm) bis zu einer Höhe von 15 cm eingefüllt. Es empfiehlt sich, dem Puffer zur Stabilisierung des Enzyms AEDTA und Mercaptoäthanol in 10^{-3}-m. Konzentration zuzusetzen. Die Proteinlösung aus dem vorhergehenden Reinigungsschritt wird zur Entfernung des KCl gegen 2 ltr. desselben Puffers dialysiert und auf die Säule aufgetragen. Mit Äquilibrationspuffer wird nachgewaschen, bis ein nachgeschalteter UV-Durchflußanalysator (Wellenlänge 28o mμ) Proteinfreiheit des Eluats anzeigt. Das am Ionenaustauscher adsorbierte Enzymprotein wird mit Hilfe eines linear von o bis o,3-m. Konzentration ansteigenden KCl-Gradienten abgelöst. Das mit einem Magnetrührer versehene und mit der Chromatographiesäule verbundene Mischgefäß enthält 2oo ml des Äquilibrationspuffers, das Vorratsgefäß dasselbe Volumen dieses Puffers mit einem Zusatz von KCl in o,3-m. Konzentration. Die Durchflußgeschwindigkeit beträgt ca. 5o ml pro Stunde. Wie die graphische Darstellung der Elution zeigt (Abb.33), erscheint das Enzym bei einer KCl-Konzentration von ca. o,o7 Mol/ltr. im Eluat. Da die Hauptmenge des inaktiven

Proteins bei dieser Konzentration des Gradienten die Säule bereits verlassen hat, kann auf diese Weise ein hoher Reinigungsfaktor erzielt werden.

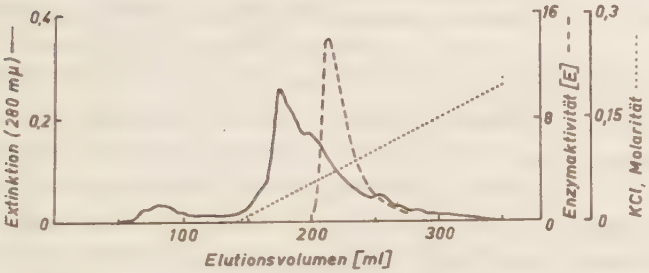

Abb. 33:
Chromatographie von Aryl-Alkohol-Oxidoreduktase an DEAE-Cellulose bei pH 7,6. Nähere Angaben im Text.

Die Ergebnisse des beschriebenen Verfahrens zur Reinigung von Aryl-Alkohol-Oxidoreduktase sind in Tab. 12 zusammengestellt. Keine weitere Anreicherung des Enzymproteins ließ sich bei Anwendung eines Fällungsschrittes mit 2 %iger Essigsäure oder durch Chromatographie an CM- oder AE-Cellulose erzielen.

1.6 Reinheit, Molekulargewicht und Stabilität des Enzyms

Die Reinheitsprüfung des auf die beschriebene Weise angereicherten Enzyms mittels Elektrophorese in Polyacryamid-Gel zeigte, daß in der Enzymlösung neben einer Hauptkomponente noch 5 sehr geringe Verunreinigungen enthalten sind. Enzymlösungen aus dem $CaPO_4$-Gelschritt, die durchschnittlich

einen Reinigungsfaktor von 3o und mehr aufweisen, sind frei von NADPH-oxidierenden Enzymen. Von diesem Schritt an kann bei der Aktivitätsbestimmung im optischen Test auf das Mitführen eines Blindwertes, in dem das Substrat Anisaldehyd weggelassen ist, verzichtet werden.

Schritt	Volumen (ml)	Protein (mg)	Gesamtaktivität (E)	spezifische Aktivität (mE/mg)	Ausbeute (%)
Rohextrakt	22o	6 38o	3o7	48,2	1oo
Protaminsulfatfällung	665	2 72o	334	123	1o9
Ammoniumsulfatfraktionierung	63	63o	271	43o	86
Adsorption an $CaPO_4$-Gel	59	14o	217	1 54o	7o
Gelfiltration an Sephadex G 2oo	34	47,2	16o	3 4oo	52
Chromatographie an DEAE-C	31	5,3	111,6	21 9oo	38

Tab.12: Anreicherung von Aryl-Alkohol:NADP-Oxidoreduktase aus Mycelien von Neurospora crassa.

Die Bestimmung des ungefähren Molekulargewichts durch Gelfiltration an Sephadex G 2oo in der für Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase beschriebenen Weise ergab einen Wert von ungefähr 7o - 8o ooo. Dieser Wert kommt dem für die NAD-abhängige Alkohol-Dehydrogenase (1.1.1.1) aus Leber angegebenen Wert von 84 ooo sehr nahe.

Das Enzym scheint sehr stabil zu sein; nach Aufbewahrung im Eisbad bei 0° unter Zusatz von $1o^{-3}$ Mol/ltr. Mercaptoäthanol ließ sich in einem Zeitraum von zwei Wochen keine Aktivitätsverminderung zeigen. Einstündige Inkubation bei 3o° in schwach alkalischem Milieu ist ebenfalls ohne Einfluß (vgl.Abb.35).

2. Eigenschaften der Aryl-Alkohol-Oxidoreduktase

2.1 Bestimmung der an der Reaktion beteiligten Coenzyme und Cofaktoren

Zur Bestimmung der an der enzymatischen Reduktion aromatischer Aldehyde beteiligten Coenzyme und Cofaktoren wurden die in Tab. 13 angeführten Versuche mit Anisaldehyd als Substrat durchgeführt. Aus den Ergebnissen geht hervor, daß das Enzym streng spezifisch für NADPH ist. Wird dieses Coenzym durch NADH ersetzt, verringert sich die Reaktionsgeschwindigkeit auf ca. 1/115 des mit NADPH gemessenen Wertes. Cofaktoren, durch deren Wirkung die enzymatische Aktivität gesteigert wird, konnten nicht gefunden werden. Mg^{2+}-Ionen in einer Konzentration von 10^{-3} Mol/ltr. sind ohne Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit; bei 10^{-2}-m. Konzentration tritt bereits eine leichte Hemmung des Enzyms ein. Zusatz von Dithiothreitol in einer Konzentration von 2 µMol/ml Testansatz führt zu einer um 30 % verringerten Reaktionsrate.

	Reaktionsgeschwindigkeit (mµMol/Min.)	relative Enzymaktivität (%)
komplettes System	10,9	100
" - Anisaldehyd	0	0
" - NADPH	0	0
" + NADH, - NADPH	0,095	0,8
" + $MgCl_2$ (10^{-3}-m.)	10,9	100
" + $MgCl_2$ (10^{-2}-m.)	10,3	94

Tab.13: Enzymatische Reduktion von Anisaldehyd zu Anisalkohol. Reaktionsansatz: 200 µMol K-Phosphatpuffer, pH 6,8; 2 µMol Anisaldehyd; 0,35 µMol NAD(P)H; 0,9 µg Protein. Gesamtvolumen 2 ml; Temperatur 30°.

2.2 Kinetik und Enzymabhängigkeit der Reaktion

Der zeitliche Verlauf der Reaktion wurde in Abhängigkeit von verschiedenen Mengen an Enzym durch Messung der Extinktionsänderung im Spektralphotometer bei 34o mμ erfaßt. Bestimmt wurde einerseits die unter NADPH-Verbrauch ablaufende Reduktion von Anisaldehyd, und andererseits die unter Oxidation von Anisalkohol zum Aldehyd verlaufende Rückreaktion, bei der gleichzeitig NADPH aus NADP gebildet wird. Die Ergebnisse sind in Abb. 34 graphisch dargestellt. Es zeigte sich, daß die Reaktion über einen Zeitraum von mindestens 1,5 Min. linear verläuft. Die auf diese Weise bestimmten Anfangsgeschwindigkeiten der enzymatischen Reaktion sind den verschiedenen im Test eingesetzten Proteinmengen direkt proportional. Auf diese Weise durchgeführte Messungen unter Verwendung von Enzymmengen, die dem in Abb. 34 angegebenen Bereich entsprechen, ermöglichen demnach die sichere Aktivitätsbestimmung unbekannter Proteinlösungen.

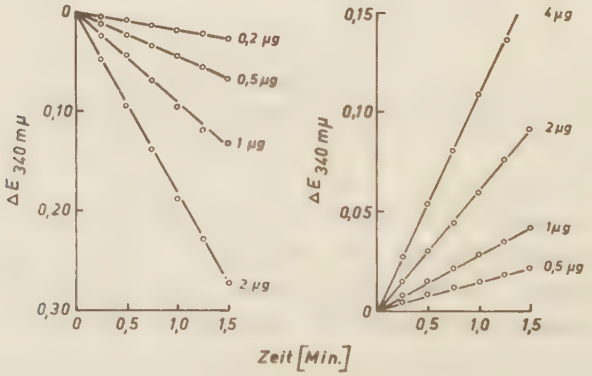

Abb.34:

Kinetik der Reduktion von Anisaldehyd (links) und der Oxidation von Anisalkohol (rechts) in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration. Ansätze: 1) 2oo μMol K-Phosphatpuffer, pH 6,8; 4 μMol Anisaldehyd; o,35 μMol NADPH; o,2-2 μg Protein. 2) 2oo μMol Tris-HCl, pH 8,7; 16 μMol Anisalkohol; o,43 μMol NADP; o,5-4,o μg Protein. Gesamtvolumen 2 ml; Temperatur 3o°.

Die Tatsache, daß die Oxidation des Alkohols trotz Anwendung höherer Proteinkonzentrationen langsamer verläuft als die Reduktion des entsprechenden Aldehyds, läßt darauf schließen, daß das Gleichgewicht der Reaktion zugunsten der Aldehydreduktion auf die Seite des Alkohols verschoben ist. Diese Annahme konnte bestätigt werden; die entsprechenden Versuche sind in einem gesonderten Kapitel beschrieben (vgl. Abschnitt 2.6)

2.3 pH-Abhängigkeit des Enzyms

Der optimale Wirkungsbereich der Aryl-Alkohol-Oxidoreduktase liegt im Falle der Aldehydreduktion bei pH 6,7 - 6,8 (vgl. Kurve A in Abb. 35), die maximale Geschwindigkeit der unter Oxidation des Alkohols verlaufenden Rückreaktion wird bei pH 8,8 erreicht (Abb. 36). Setzt man das Enzym vor der Aktivitätsbestimmung der Einwirkung verschiedener H^+-Ionenkonzentrationen aus, so läßt sich sein Stabilitätsoptimum bestimmen. Dieses liegt in einem pH-Bereich von 7,5 - 9,5. Bei pH-Werten unter 7,o verliert das Enzym mit zunehmender Acidität der Lösung sehr rasch an Aktivität; nach einstündiger Inkubation bei 3o° und pH 5,7 erfolgt bereits völlige Inaktivierung (vgl. Abb. 35, Kurve B).

2.4 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration

Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von den Konzentrationen der eingesetzten Substrate wurde sowohl für die Hin-, als auch für die Rückreaktion bestimmt. Im Falle der Reduktion ermittelten wir bei einem pH-Wert von 6,8 Michaeliskonstanten von $5 \cdot 10^{-4}$ Mol/ltr. für Anisaldehyd und 10^{-4} Mol/ltr. für NADPH; Substratsättigung wird bei Konzentrationen von 1,5 bzw. o,3 µMol pro ml Testansatz erreicht (vgl. Abb. 37,38). Für die Rückreaktion (pH 8,8) wurden für die Substrate Anisalkohol und NADP Sättigungswerte von 8,o und o,3 µMol/ml Testansatz und K_m-Werte von $1,7 \cdot 10^{-3}$, bzw. $2,4 \cdot 10^{-5}$ Mol/ltr. bestimmt (Abb. 39, 4o).

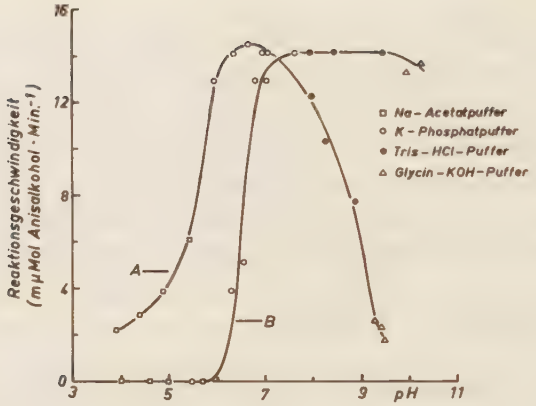

Abb.35:

Abhängigkeit der Aryl-Alkohol-Oxidoreduktase vom pH-Wert. (A) Aktivitätsbestimmung des Enzyms bei den angegebenen pH-Werten; (B) 6o Min. Inkubation des Enzyms bei 3o° und den angegebenen pH-Werten, Aktivitätsbestimmung anschließend bei pH 6,8. Reaktionsansatz: 2oo µMol Puffer; 2 µMol Anisaldehyd; o,35 µMol NADPH; 1,5 µg Protein; Gesamtvolumen 2 ml; Temperatur 3o°.

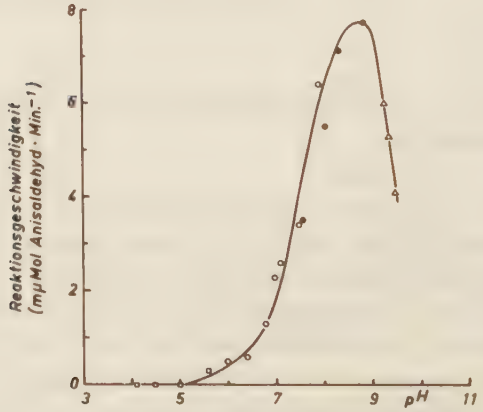

Abb.36:

Abhängigkeit der enzymatischen Oxidation von Anisalkohol vom pH-Wert. Die Symbole für die verwendeten Puffersysteme sind in Abb. 35 aufgeführt. Reaktionsansatz: 2oo µMol Puffer; 2 µMol Anisalkohol; o,43 µMol NADP; 6 µg Protein; Gesamtvolumen 2 ml; Temperatur 3o°.

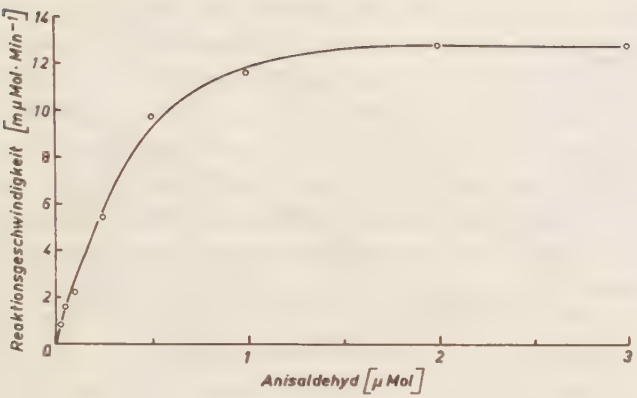

Abb.37:

Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Anisaldehydkonzentration. Reaktionsansatz: 2oo µMol K-Phosphatpuffer, pH 6,8; o,35 µMol NADPH; o,9 µg Protein. Aldehydmenge variiert von o,o25 - 3 µMol/ml. Gesamtvolumen 2 ml; Temperatur 3o°.

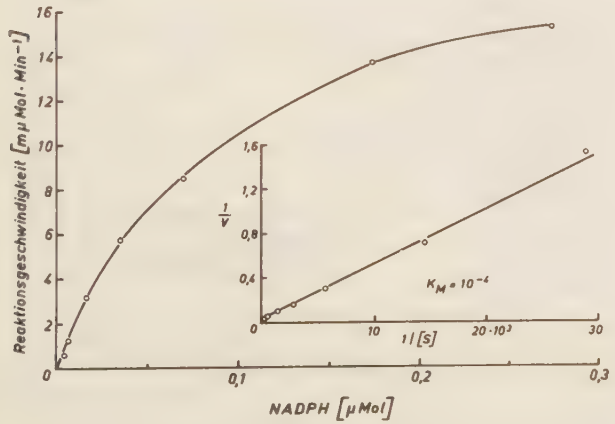

Abb.38:

Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der NADPH-Konzentration. Reaktionsansatz: 2oo µMol K-Phosphatpuffer, pH 6,8; 4 µMol Anisaldehyd; o,9 µg Protein. NADPH-Menge variiert von o,oo35 - o,28 µMol/ml. Gesamtvolumen 2 ml; Temperatur 3o°.

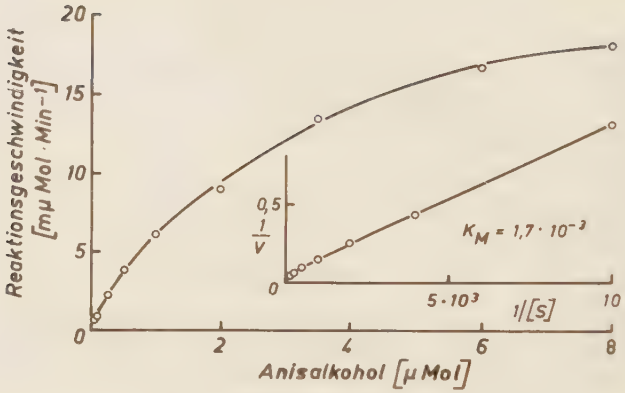

Abb. 39:

Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Anisalkoholkonzentration. Reaktionsansatz: 2oo µMol Tris-HCl, pH 8,7; o,43 µMol NADP; 4,5 µg Protein. Alkoholmenge variiert von o,o5 - 8 µMol/ml. Gesamtvolumen 2 ml; Temperatur 3o°.

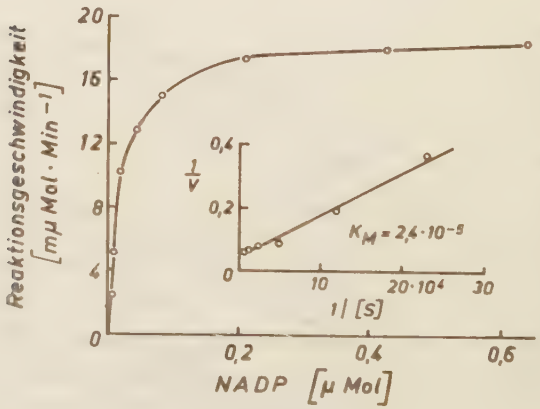

Abb. 4o:

Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der NADP-Konzentration. Reaktionsansatz: 2oo µMol Tris-HCl, pH 8,7; 16 µMol Anisalkohol; 4,5 µg Protein; NADP-Menge variiert von o,oo4 - o,64 µMol/ml. Gesamtvolumen 2 ml; Temperatur 3o °.

2.5 Temperaturabhängigkeit der Aryl-Alkohol-Oxidoreduktase

Die Ermittlung der Temperaturabhängigkeit der Anisaldehydreduktion erfolgte durch Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion im Enzymtest. Wie aus Abb. 41 hervorgeht, steigt diese bis zu einer Temperatur von 55° linear an. Da jede Messung in der sehr kurzen Zeit von nur 45 bis 60 Sek. nach Enzymzugabe beendigt war, sind Beeinflussungen durch Temperatursensibilität des Enzyms weitgehend ausgeschaltet. Es zeigte sich, daß bei Temperaturen über 45° die Reaktion sehr schnell zum Stillstand kommt; so läßt sich z.B. bei 55° bereits 60-75 Sek. nach Reaktionsbeginn keine Extinktionsabnahme mehr beobachten. Diese Tatsache zeigt, daß die Aryl-Alkohol-Oxidoreduktase bei diesen Temperaturen bereits einer beträchtlichen Hitzeinaktivierung unterliegt.

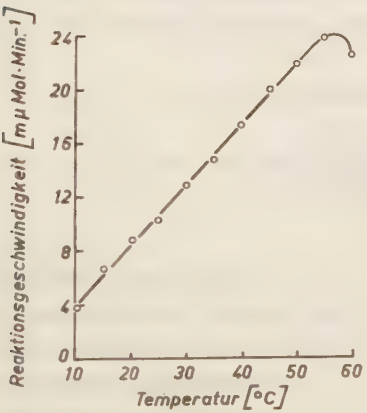

Abb. 41:
Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Reduktion von Anisaldehyd. Reaktionsansatz: 200 µMol K-Phosphatpuffer, pH 6,8; 4 µMol Anisaldehyd; 0,35 µMol NADPH; 0,9 µg Protein; Gesamtvolumen 2 ml.

Aus den erhaltenen Meßwerten wurde die Aktivierungsenergie E nach der Formel

$$E = \frac{4{,}575 \cdot T_1 \cdot T_2}{T_2 - T_1} \cdot \log \frac{k_2}{k_1}$$

errechnet, wobei k_1 und k_2 beliebige Geschwindigkeitskonstanten bei den absoluten Temperaturen T_1 und T_2 (^{o}K)

darstellen. Für den Temperaturbereich von 3o-4o° ergab sich für E ein Wert von 5 75o cal/Mol. Durch Einsetzen dieses Wertes in die Gleichung

$$E = o,457 \cdot T_1 \cdot T_2 \cdot \log Q_{1o}$$

läßt sich der Temperaturkoeffizient Q_{1o} ermitteln. Für den oben angegebenen Temperaturbereich erhält man einen Wert von 1,37. Dies unterstreicht den enzymatischen Charakter der Reaktion, da in diesen Fällen die Temperaturkoeffizienten gewöhnlich zwischen 1 und 2 liegen.

2.6 Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten

Das Enzym Aryl-Alkohol:NADP-Oxidoreduktase katalysiert die nach folgender Gleichung verlaufende Reaktion:

$$\text{Aldehyd} + \text{NADPH} + H^+ \rightleftharpoons \text{Alkohol} + \text{NADP}^+$$

Zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstante

$$K = \frac{(\text{Aldehyd})(\text{NADPH})(H^+)}{(\text{Alkohol})(\text{NADP}^+)}$$

müssen die Konzentrationen aller Reaktionspartner nach Stillstand der Reaktion bekannt sein. Dazu wurden Ansätze mit o,5 und o,25 µMol Alkohol/ml, NADP und einem Überschuß an Enzym bei 3o° inkubiert und die der NADPH-Bildung entsprechende Extinktionszunahme bei 34o mµ bestimmt. Da Aldehyd und NADPH stets im selben Verhältnis gebildet werden müssen, lassen sich aus dem gemessenen Wert über den molaren Extinktionskoeffizienten von NADPH ($\varepsilon = 6,22 \cdot 10^6$ cm^2/Mol) die Gleichgewichtskonzentrationen von Alkohol, Aldehyd, NADP und NADPH errechnen. Die genaue H^+-Ionenkonzentration jeder Probe wurde anschließend durch exakte Messung des pH ermittelt. Diese Bestimmungen wurden bei verschiedenen pH-Werten

zwischen 6,9 und 8,2 durchgeführt. Als Mittelwert aus diesen Ergebnissen erhielten wir für die Substrate Zimtalkohol und Anisalkohol Gleichgewichtskonstanten K von $1{,}3 \cdot 10^{-10}$, bzw. $1{,}1 \cdot 10^{-10}$. Daraus folgt, daß das Gleichgewicht der Reaktion sehr weit auf der Seite der Alkoholbildung liegt, wie dies auch schon ein Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten der Hin- und Rückreaktion andeutet (vgl. Abschnitt 2.2).

2.7 Hemmung der Aryl-Alkohol-Oxidoreduktase

Durch Zusatz von SH-Gruppen blockierenden Reagenzien in 10^{-3}-m. Konzentration konnte eine Hemmung der Aryl-Alkohol-Oxidoreduktase erreicht werden. p-Chloromercuribenzoat und p-Diazobenzolsulfonsäure inaktivieren das Enzym völlig, nach Einwirkung von o-Jodosobenzoat verbleibt nur noch eine Restaktivität von 10 % des Vergleichswertes. Andererseits zeigen typische SH-Gifte wie N-Äthylmaleinimid oder Jodessigsäure keine Wirkung (Tab. 14).

Zusatz (Konzentration 10^{-3}-m.)	Reaktionsgeschwindigkeit (ΔE/Min.)	Hemmungskoeffizient
ohne Zusatz	0,040	0
N-Äthylmaleinimid	0,040	0
Jodessigsäure	0,040	0
o-Jodosobenzoesäure	0,004	90
p-Diazobenzolsulfonsäure	0	100
p-Chloromercuribenzoat	0	100

Tab. 14: Hemmung der Aryl-Alkohol-Oxidoreduktase. Alle Proben wurden mit den Zusätzen 10 Min. bei 30° vorinkubiert und dann mit NADPH gestartet. Reaktionsansatz (2 ml): 200 µMol K-Phosphatpuffer, pH 6,8; 4 µMol Anisaldehyd; 0,8 µg Protein; 2 µMol Hemmstoff; 0,35 µMol NADPH.

2.8 Substratspezifität der Aryl-Alkohol-Oxidoreduktase

Die Ermittlung der relativen Aktivität einer Reihe von Alkoholen und Aldehyden erfolgte durch Messung der Anfangsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion im Spektralphotometer. Die Ergebnisse sind in Tab. 15 zusammengestellt. Daraus geht hervor, daß die Aryl-Alkohol-Oxidoreduktase geringe Substratspezifität besitzt. So werden neben einer Reihe von Phenylcarbinolen auch Zimtalkohol und Coniferylalkohol dehydrogeniert. Methanol wird durch das Enzym nicht umgesetzt, Äthanol nur in sehr geringem Maße. Mit steigendem Molekulargewicht der aliphatischen Alkohole nimmt die Umsatzrate jedoch beträchtlich zu. Eine Ausnahme macht iso-Propanol; die in diesem Falle zu einem Keton führende Reaktion ist stark gehemmt. Auch die Umkehrung der Reaktion verläuft sehr unspezifisch. In ihrem Verlauf wird eine Vielzahl von Aldehyden zu den entsprechenden Alkoholen reduziert. Neben einer Reihe von Benzaldehyden werden Zimtaldehyd und auch Acetaldehyd mit guten Ausbeuten umgesetzt.

Das Enzym setzt demnach zwar aliphatische Verbindungen um, reagiert jedoch im allgemeinen mit phenylsubstituierten Aldehyden, bzw. Alkoholen wesentlich schneller. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß das Enzym unter bevorzugter Umsetzung primärer Alkohole (bzw. Aldehyde) spezifisch für aromatische Verbindungen ist. Dies wird bestätigt durch einen Vergleich der nach LINEWEAVER und BURK ermittelten K_m-Werte für Anisaldehyd (5.10^{-4} Mol/ltr.) und Acetaldehyd ($1.7 \cdot 10^{-3}$ Mol/ltr.; Abb. 42). Das Substrat mit der niedrigeren Michaeliskonstanten - in diesem Falle Anisaldehyd - wird allgemein als das natürliche Substrat eines Enzyms bezeichnet.

Substrat	relative Enzymaktivität (%)	Substrat	relative Enzymaktivität (%)
Benzylalkohol	3o	Benzaldehyd	96
Salicylalkohol	23	Salicylaldehyd	59
p-Hydroxybenzylalkohol	23	p-Hydroxybenzaldehyd	13
Anisalkohol	1oo	Anisaldehyd	1oo
-	-	Vanillin	o,4
Veratrylalkohol	135	Veratrylaldehyd	96
-	-	Syringaaldehyd	o
3.4-Methylendioxybenzylalkohol	11o	-	-
-	-	3.4.5-Trimethoxybenzaldehyd	93
Zimtalkohol	145	Zimtaldehyd	1o2
Coniferylalkohol	(+)	-	-
Methanol	o	-	-
Äthanol	2	Acetaldehyd	62
n-Propanol	18	-	-
iso-Propanol	2	-	-
n-Butanol	37	-	-
Amylalkohol	3o	-	-

Tab. 15: Substratspezifität der Aryl-Alkohol-Oxidoreduktase. Die Zahlen geben die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion an, bezogen auf Anisalkohol, bzw. Anisaldehyd = 1oo %. Coniferylalkohol wird umgesetzt, der gebildete Aldehyd verursacht im Enzymtest eine so starke Gelbfärbung, daß die Reaktionsgeschwindigkeit nicht mehr messbar ist. Reaktionsansätze wie im Abschnitt "Aktivitätsbestimmung" angegeben.

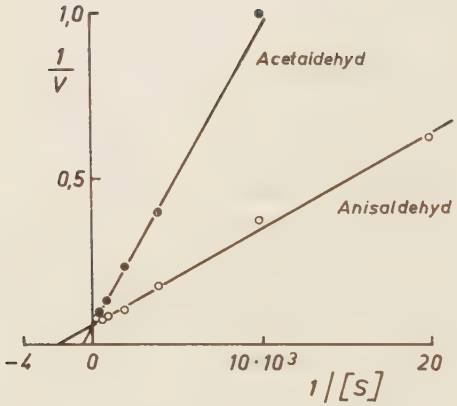

Abb. 42:
Bestimmung der Michaeliskonstanten von Acetaldehyd und Anisaldehyd nach LINEWEAVER und BURK. K_m-Acetaldehyd = $1{,}7 \cdot 10^{-3}$ Mol/ltr. K_m Anisaldehyd = $5 \cdot 10^{-4}$ Mol/ltr. Reaktionsansätze wie bei Abb. 37 angegeben.

Unter besonderer Berücksichtigung der pH-Optima und der Substratspezifität durchgeführte Vergleiche mit einer Vielzahl NADP-abhängiger Alkohol-Oxidoreduktasen ergaben, daß das von uns gefundene und gereinigte Enzym mit keinem bereits beschriebenen Enzym identisch sein kann. Auf Grund der vorliegenden Resultate schlagen wir deshalb als systematischen Namen für das Enzym die Bezeichnung Aryl-Alkohol: NADP-Oxidoreduktase vor; in das Enzymverzeichnis der "International Union of Biochemistry" ist es in die Gruppe 1.1.1 einzureihen.

F. Reduktion aromatischer Säuren durch zellfreie Extrakte aus Polystictus (Trametes) versicolor

1. Gewinnung zellfreier Extrakte aus den Mycelien

Die Anzucht und Vorbehandlung der als Enzymquelle dienenden Mycelien erfolgte in der bereits im experimentellen Teil beschriebenen Weise. Zur Bereitung eines zellfreien Extrakts wurde das eingefrorene Material mit Quarzsand und soviel o,1-m. Tris-HCl-Puffer, pH 7,6 + 10^{-2} Mol/ltr. L-Cystein im vorgekühlten Mörser 5-10 Min. lang verrieben, bis ein nicht zu dünnflüssiger Brei entstand. Der Zusatz von Cystein erwies sich dabei als absolut notwendig zur Stabilisierung des Enzyms. Das Homogenat wurde zentrifugiert (10 Min., 30 000 × g), der Rohextrakt abgegossen und mit festem Ammoniumsulfat fraktioniert. Die Hauptmenge des aktiven Proteins fiel dabei bei Sättigung o,4-o,6. Der durch Zentrifugieren dieser Fraktion erhaltene Niederschlag wurde in Tris-Cystein-Puffer (s.o.) aufgenommen und sofort bei -15° eingefroren. Auf diese Weise wurde ein dunkelbrauner Extrakt erhalten, in dem bei 20-50 % Ausbeute an Gesamtaktivität das reduzierende System 1,5-2,3-fach angereichert war. Diese Proteinlösung ist sehr labil und verliert bei 0° ihre enzymatische Aktivität innerhalb von 10-12 Stunden völlig. Weitere Anreicherungsversuche (Säurefällung, Protaminsulfatfällung, Fraktionierung mit Aceton) führten zu keinem Erfolg, da sie stets eine völlige Inaktivierung des Enzyms bewirkten.

2. Eigenschaften des aromatische Säuren reduzierenden Enzymsystems aus Polystictus (Trametes) versicolor

Der Nachweis der enzymatischen Reduktion aromatischer Säuren durch zellfreie Extrakte aus Mycelien von Polystictus (Trametes) versicolor wurde bereits in einem früheren

Kapitel (C 2.1) beschrieben. Welche Coenzyme und Cofaktoren an der Reaktion beteiligt sind, wurde in einem Versuch bestimmt, dessen Ergebnisse in Tab. 16 zusammengestellt sind.

	Veratrumsäure reduziert (mµMol)	relative Enzymaktivität (%)
Komplettes System	37,o	loo
" - CoA	36,5	96
" - ATP	o,o	o
" - NADPH	o,o	o
" - $MgCl_2$	3,1	8

Tab.16: Enzymatische Reduktion von Veratrumsäure. Bestimmung von Cofaktoren und Coenzymen. Reaktionsansatz: loo µMol Tris-HCl, pH 7,6; 2,5 µMol = $3,75.10^5$ ipm Veratrumsäure-(-7-^{14}C); 1 µMol NADPH; 5 µMol ATP; lo µMol $MgCl_2$; o,5 µMol CoA; lo µMol KF; lo mg Protein; Gesamtvolumen 1 ml. Inkubation 6o Min. bei 3o°.

Wie daraus ersehen werden kann, läuft die Reaktion unabhängig von zugesetztem CoA ab. Die geringe Förderung der Reduktion bei CoA-Zugabe läßt sich auf den schützenden Einfluß von Sulfhydrylverbindungen gegen Inaktivierung dieses äußerst empfindlichen Enzymsystems zurückführen. Das System ist absolut abhängig von ATP und NADPH. Wird ATP durch GTP, ITP, CTP oder UTP ersetzt, so zeigt sich, daß bei den verschiedenen Nucleosidtrisphosphaten nur 1-lo % der Aktivität von Kontrollen mit ATP erreicht werden. NADH zeigt im Testansatz nur 1/5 der Aktivität von NADPH. Mg^{2+}-Ionen scheinen für die Reaktion unerläßlich zu sein. Zusatz von SH-Gruppen tragenden Reagenzien steigert die Reaktionsrate des Enzymsystems.

Trotz des oben erwähnten Befundes konnte nicht völlig ausgeschlossen werden, daß CoA nicht doch an der Reduktion teilnimmt, da der Rohextrakt, obwohl er mit Ammoniumsulfat gefällt war, noch sättigende Mengen an CoA enthalten konnte. Aus diesem Grunde wurde der durch Ammoniumsulfatfällung gewonnene Extrakt einer Gelfiltration durch Sephadex G 25 unterworfen, um die niedermolekularen Bestandteile der Lösung vom Protein abzutrennen. Auch nach dieser Reinigung konnte keine Notwen-

digkeit für CoA im Enzymtest gefunden werden. Letzte Sicherheit gab ein Versuch, bei dem ^{14}C-markiertes Veratroyl-CoA mit einer spezifischen Aktivität von o,5 µC/µMol in den Enzymtest eingesetzt wurde, wogegen ATP, CoA und freie Veratrumsäure weggelassen wurden. Auch in diesem Falle fand keine Reduktion statt. Diese Ergebnisse machen es somit sehr wahrscheinlich, daß auch in diesem Falle lediglich ATP, nicht aber CoA an der Aktivierung der Carboxylgruppe dieser aromatischen Säure beteiligt ist.

Es konnte gezeigt werden, daß das Enzymsystem auch Anissäure zu reduzieren vermag. Die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen dieses Substrates ergab ein Optimum bei ca. 5 µMol/ml Testansatz. Bei höheren Konzentrationen zeigt sich eine ausgeprägte Hemmung durch das Substrat. Das pH-Optimum liegt bei pH 7,6 (Trispuffer), das Temperaturoptimum bei 3o-32°. Bei höheren Temperaturen nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit sehr schnell ab, d.h., das Enzym ist außerordentlich temperaturempfindlich.

IV. DISKUSSION

Es sind seit längerer Zeit Mikroorganismen bekannt, die zur Reduktion der Carboxylgruppe aromatischer Säuren befähigt sind. Sie gehören fast ausnahmslos zur Klasse der Basidiomyceten (FARMER et al., 1959: HURST et al., 1962; HURST, 1963); dieses Reduktionsvermögen wurde jedoch auch bei Ascomyceten (BACHMANN et al., 196o; RAMAN und SHANMUGASUNDARAM, 1963) und Bakterien (SLOANE et al., 1963) nachgewiesen. Die Reduktion aromatischer Säuren zum Aldehyd in einem zellfreien System gelang erstmals in dieser Arbeit durch Inkubation von Mycelhomogenaten aus dem Basidiomyceten Polystictus (Trametes) versicolor und dem Ascomyceten Neurospora crassa. Die beiden von uns in diesen Organismen nachgewiesenen Enzyme zeigen in ihren Eigenschaften große Ähnlichkeit. Sie benötigen beide die Coenzyme ATP und NADPH und werden durch SH-Reagenzien in ihrer Aktivität gesteigert; ihre pH-Optima liegen bei pH 7,6 - 8,o. Der Zusatz von CoA ist in beiden Fällen ohne Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit, d.h., die Aktivierung der Carboxylgruppe erfolgt in allein ATP-abhängiger Reaktion.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Enzymsystemen besteht darin, daß das Enzym aus Polystictus (Trametes) versicolor konstitutiver Art ist, während in Neurospora crassa die Synthese eines aromatische Säuren reduzierenden Enzyms induzierbar ist. Läßt man den letztgenannten Pilz in Abwesenheit von Salicylsäure wachsen, so finden sich in den Mycelien nur an der Grenze der Nachweisbarkeit liegende Spuren von Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase. Bei Anzucht in einem salicylsäurehaltigen Nährmedium findet sich dagegen in den Zellen die 1 ooo - 1o ooo-fache Menge dieses Enzyms. Interessanterweise läßt sich diese Induktion durch das Substrat nur bei Zugabe von Salicylsäure erzielen. Bei

Applikation einer Reihe weiterer Phenylcarbonsäuren mit verschiedenem Substitutionsmuster (vgl. Abschnitt B.1) ist keine Bildung von Reduktionsprodukten zu beobachten, obwohl diese Säuren in vitro durch das Enzym zum Teil besser als Salicylsäure umgesetzt werden. Diese Tatsache kann durch die Annahme einer sehr spezifischen Wirkung des induzierenden Agens auf den Repressor erklärt werden. Denkbar ist jedoch auch eine Steuerung durch unterschiedliche Aufnahme der applizierten Substanzen in das Zellinnere. So könnte etwa nach dem von COHEN und MONOD (1957) postulierten Schema eine für Salicylsäure spezifische und eventuell durch das Substrat induzierte Permease diese Säure bevorzugt in den Protoplasten transportieren, während andere Säuren nicht aufgenommen werden. Die Existenz derartiger Enzyme konnte in letzter Zeit sehr wahrscheinlich gemacht werden (vgl. z.B. KENNEDY und SCARBOROUGH, 1967; SCHAEFLER und SCHENKEIN, 1968; KLINGMÜLLER 1967 a,b).

Der Basidiomycet Polystictus (Trametes) versicolor ist ein Weißfäulepilz, d.h. er verwertet den Ligninanteil des Holzes als Energiequelle. Der Abbau erfolgt durch Oxidation des Substrates mit Hilfe von Enzymen vom Laccase-Typus (MALMSTRÖM et al., 1958). Ein großer Teil der durch diese Degradation entstehenden Verbindungen sind Phenylcarbon- und Phenylacrylsäuren (HENDERSON, 1955; ISHIKAWA et al., 1963 a,b). Von diesen Säuren ist bekannt, daß sie im lebenden Organismus toxisch wirken und daher entgiftet werden müssen; als Beispiele hierfür wären etwa die Bildung von Hippursäure (SCHACHTER und TAGGART, 1953) oder von Konjugaten aus Glycin und verschiedenen Zimtsäuren (ARMSTRONG et al., 1956) anzuführen. Von verschiedenen Bodenpilzen weiß man, daß sie die bei der Ligninoxidation anfallenden phenylsubstituierten Säuren zu nicht aromatischen Verbindungen abbauen (HENDERSON, 1957). Polystictus (Trametes) versicolor besitzt diese Fähigkeit offensichtlich nicht, sondern reduziert diese

Säuren zu Aldehyden und Alkoholen und gibt diese in das Kulturmedium ab. Man muß deshalb annehmen, daß die unter Energieverbrauch ablaufende Reduktion der Säuren der Entgiftung dient; die toxisch wirkende Carboxylgruppe wird auf diese Weise in eine physiologisch verträglichere Aldehyd- oder Alkoholgruppe umgewandelt. Die Toxidität phenolischer Säuren zeigt sich sehr deutlich in der für Neurospora crassa beschriebenen starken Wachstumsverminderung bei Anwesenheit von Salicylsäure im Kulturmedium. Diese Hemmung ist proportional der Konzentration an eingesetzter Säure; nach Reduktion der Säure nimmt das Wachstum wieder stark zu. Zu einer gleichen Schlußfolgerung führte auch ein Versuch, bei dem Salicylsäure erst nach Erreichen der stationären Wachstumsphase in das Kulturmedium zugegeben wurde. Die Pilzmycelien, die in diesem Falle offensichtlich nicht mehr in der Lage waren, reduzierende Enzyme zu bilden, starben daraufhin in kurzer Zeit ab. Dies könnte eine Parallele zu der von REZNIK (1960) in höheren Pflanzen angenommenen Entgiftung von Zimtsäuren sein; er betrachtet das Lignin "als lokales Exkretionsprodukt", entstanden durch Reduktion der Zimtsäuren zu den entsprechenden Aldehyden und Alkoholen mit nachfolgender Polymerisation und Ablagerung in der Zellwand. Die ständige Notwendigkeit der Entgiftung könnte auch der Grund dafür sein, daß die Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase aus Polystictus (Trametes) versicolor konstitutiv ist.

Für den Pilz Neurospora crassa, der in der Natur auf ganz anders gearteten Substraten lebt, besteht dieser Zwang zur Entgiftung nicht. Es ist deshalb von Vorteil, wenn die Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase erst bei Bedarf induziert und gebildet wird. Daß Phenylcarbonsäuren auch auf diesen Pilz toxisch wirken, wurde bereits dargelegt (s.o.).

Ob ein der von uns gefundenen Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase ähnliches Enzymsystem zur Reduktion aromatischer Säuren auch in höheren Pflanzen vorkommt, wäre besonders im Hinblick

auf die noch nicht bekannte Bildungsweise der verschiedenen Zimtalkohole im Verlauf der Ligninbiosynthese von Interesse. Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit beschriebenen Enzymsystemen, bei denen zur Aktivierung der Carboxylgruppe lediglich ATP verbraucht wird, postuliert man für die Reduktion von Zimt- und Benzoesäuren in höheren Pflanzen das intermediäre Auftreten von Coenzym A-Thiolestern dieser Säuren (NEISH, 1964; El-BASYOUNI und NEISH, 1966; HIGUCHI und BROWN, 1963; ZENK, 1965, 1966, 1967). Diese Annahme stützt sich besonders auf die Untersuchungen über den Abbau der Zimtsäuren zu Benzoesäuren. Da hierbei ein C_2-Bruchstück als Acetat oder Acetyl-CoA freigesetzt wird, läßt dies auf einen Abbauweg nach dem bekannten Schema der ß-Oxidation von Fettsäuren schließen (VOLLMER et al., 1965; ZENK, 1966).

Demnach müßten sowohl Zimtsäuren, als auch Benzoesäuren in Form der energiereichen CoA-Ester auftreten und sich als die für eine Reduktion der Carboxylgruppe benötigten aktivierten Verbindungen geradezu anbieten. NEISH und Mitarbeiter konnten in Acetonpulvern von Homogenaten aus Weizen- und Gerstenkeimlingen das Auftreten von proteingebundener Zimt-, p-Cumar-, Kaffee- und Ferulasäure nachweisen. Möglicherweise handelt es sich hierbei um aktivierte, enzymgebundene Säuren; die zur Aktivierung der Carboxylgruppe benötigte Energie könnte durch die vorhergehende Bildung eines CoA-Esters bereitgestellt werden. Nach Reduktion dieser Intermediärprodukte könnten die entstehenden Alkohole in den Ligninbiosyntheseweg eingeschleust werden (El-BASYOUNI et al., 1964; El-BASYOUNI und TOWERS, 1964; El-BASYOUNI und NEISH, 1966).

In ganzen Blättern von Salix purpurea konnte die Bildung von Salicylalkohol aus o-Cumarsäure nachgewiesen werden; diese verläuft über Salicylaldehyd als Intermediärprodukt. Da andererseits applizierte Salicylsäure nicht reduziert

wird, muß man wiederum annehmen, daß durch ß-Oxidation der o-Cumarsäure entstehendes Salicyloyl-CoA das aktivierte, reduzierbare Intermediärprodukt darstellt (ZENK, 1967). Versuche im Rahmen dieser Arbeit, die Bildung von Salicylalkohol im zellfreien System durch Homogenate von Salixblättern nachzuweisen, führten trotz Zugabe von ATP, CoA, NADH und NADPH bis jetzt noch zu keinem Erfolg.

Sollten die obengenannten Hypothesen zutreffen, so müßte man annehmen, daß in den Reduktionsmechanismen zwischen höheren und niederen Pflanzen ein tiefgreifender Unterschied besteht. Auf alle Fälle ist jedoch die Möglichkeit gegeben, die zum Aufbau des Lignins benötigten phenylpropanoiden Einheiten (Zimtalkohole und -aldehyde) mit Hilfe der beschriebenen Enzymsysteme auf einfache Weise radioaktiv markiert darzustellen. Dies sollte es erlauben, die Untersuchungen über die Struktur und die Biogenese des Lignins höherer Pflanzen weiter voranzutreiben. Dadurch könnten auch die in dieser Arbeit an Pilzen durchgeführten Studien zur Reduktion aromatischer Säuren dazu beitragen, neue Kenntnisse über diesen wichtigen Naturstoff zu erlangen.

Bis jetzt ist weder der Nachweis CoA-aktivierter substituierter Phenylacrylsäuren im Pflanzenreich, noch eine Darstellung dieser Verbindungen mit Hilfe von Enzympräparationen aus höheren Pflanzen gelungen (HAHLBROCK, 1965). Auch eine Synthese der Phenylacryl-Thiolester auf chemischem Wege erscheint durch das Fehlen geeigneter Schutzgruppen für die phenolische OH-Gruppe hydroxylierter Zimtsäuren bis jetzt kaum möglich. Die in dieser Arbeit beschriebene, relativ einfache Methode zur Darstellung dieser vielfach postulierten CoA-Ester, die sich der katalytischen Wirkung von Acyl-CoA-Ligase bedient, sollte deshalb die Aufklärung der Biosynthesewege einer Vielzahl von Pflanzeninhaltsstoffen erleichtern.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Mit Hilfe von Acyl-CoA-Ligase (EC 6.2.1.2) wurden die CoA-Ester einer Reihe verschieden substituierter Phenylcarbon- und Phenylacrylsäuren dargestellt und präparativ gewonnen. Ihre Charakterisierung erfolgte durch Aufnahme der UV-Spektren, sowie der Spektren nach Hydrolyse oder Hydroxylaminolyse. Die Absorptionsmaxima, bzw. die Maxima der Differenzspektren der Thiolester wurden außerdem in einem optischen Test nach vollständiger Umsetzung einer genau bestimmten Menge an CoA-SH ermittelt. Die Maxima liegen in Abhängigkeit vom Substitutionsmuster der jeweiligen Säure zwischen 311 und 363 mμ; der molare Extinktionskoeffizient beträgt durchschnittlich $2o \cdot 1o^6$ cm^2/Mol. Als Nachweis der Aktivierung der einzelnen Säuren diente neben der Bestimmung im optischen Test die colorimetrische Bestimmung durch den Hydroxamsäuretest. Die physiologische Aktivität der CoA-Ester wurde durch ihre Umsetzung mit Glycin unter der Katalyse von Acyl-CoA:Glycin-N-Acyltransferase (EC 2.3.1.13) bewiesen.

2. Die in vivo-Reduktion aromatischer Säuren durch Mycelien von Neurospora crassa wurde in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen an Salicylsäure ($1{,}25 \cdot 1o^{-3}$ bis $1o^{-2}$ Mol/ltr.) in ihrem zeitlichen Verlauf untersucht. Die eingesetzte Säure wurde je nach Konzentration in einem Zeitraum von 6o bis 12o Stunden nahezu vollständig zu Salicylalkohol reduziert. Mit steigender Menge an Salicylsäure ließ sich eine zunehmende Hemmung des Pilzwachstums beobachten. Bei Inkubation mehrerer Phenylcarbonsäuren mit anderem Substitutionsmuster konnte keine Bildung von Reduktionsprodukten nachgewiesen werden.

3. Es konnte erstmals die Reduktion einer aromatischen Säure (Salicylsäure) in einem zellfreien System nachgewiesen werden. Als Enzymquelle dienten Rohextrakte aus Mycelien von Neurospora crassa. Das Enzym, dessen Bildung durch Zugabe von Salicylsäure in das Kulturmedium induziert wird, katalysiert die Reaktion

$$Ar\text{-}COOH + ATP + NADPH + H^+ \longrightarrow Ar\text{-}CHO + ADP + NADP^+ + PO_4^{3-} + H_2O$$

und benötigt Mg^{2+}-Ionen und SH-Gruppen als Cofaktoren. Als systematischer Name wurde die Bezeichnung Aryl-Aldehyd:NADP-Oxidoreduktase (ADP) vorgeschlagen (EC-Gruppe: 1.2.1).

4. Die Reinigung der Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase erfolgte in sechs Schritten (Protaminsulfatfällung, Ammoniumsulfatfraktionierung, Adsorption an $CaPO_4$-Gel, Chromatographie an TEAE-C, pH 7,6, Hydroxylapatit und TEAE-C, pH 8,4); der erzielte Reinigungsfaktor betrug ca. 3oo bei einer durchschnittlichen Ausbeute von 5o %.

5. Das pH-Optimum der Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase liegt bei 8,o, der optimale Temperaturbereich bei 36°; das Molekulargewicht beträgt ca. 12o ooo. Außer Salicylsäure wird eine große Zahl aromatischer Säuren umgesetzt; die Reaktionsgeschwindigkeit hängt in starkem Maße von Zahl und Art der Kernsubstituenden ab. Gegenüber aliphatischen Säuren zeigt das Enzym keine Aktivität. Das Auftreten eines freien aktivierten Intermediärprodukts ließ sich nicht nachweisen; am wahrscheinlichsten erscheint die Annahme einer enzymgebunden verlaufenden Reaktion.

6. Aus Mycelien von Neurospora crassa konnte weiterhin eine NADP-spezifische Aryl-Alkohol-Oxidoreduktase (EC-Gruppe 1.1.1) isoliert werden. Dieses Enzym katalysiert die Reaktion $Ar\text{-}CHO + NADPH + H^+ \rightleftharpoons Ar\text{-}CH_2OH + NADP^+$; das Gleichgewicht ist weit auf die Seite der Alkoholbildung verschoben. Cofaktoren werden nicht benötigt. Das Enzym ist konstituiver Art.

7. Die Reinigung der Aryl-Alkohol-Oxidoreduktase erfolgte in fünf Schritten (Protaminsulfatfällung, Ammoniumsulfatfraktionierung, Adsorption an $CaPO_4$-Gel, Gelfiltration an Sephadex G 200 und Chromatographie an DEAE-C); bei ca. 40 % Ausbeute wurde eine 450-fache Anreicherung erzielt.

8. Das pH-Optimum der Aryl-Alkohol-Oxidoreduktase liegt für die Reduktion von Aldehyden bei 6,8; im Falle der Rückreaktion bei pH 8,8. Das Molekulargewicht beträgt ungefähr 80 000. Das Enzym reagiert mit einer Vielzahl aromatischer und aliphatischer Aldehyde, bzw. Alkohole, jedoch werden aromatische Verbindungen im allgemeinen wesentlich schneller umgesetzt. Die Möglichkeit einer Identität des Enzyms mit einer bereits beschriebenen NADP-abhängigen Alkohol-Oxidoreduktase wurde durch Vergleich der Substratspezifität ausgeschlossen. Durch Zusatz von SH-Gruppen blockierenden Reagenzien ließ sich in mehreren Fällen die weitgehende oder völlige Inaktivierung des Enzyms erreichen; dies macht die Beteiligung von SH-Gruppen am Wirkungsmechanismus des Enzyms wahrscheinlich.

9. Ein der Aryl-Aldehyd-Oxidoreduktase aus Neurospora crassa analoges Enzym konnte in Mycelhomogenaten von Polystictus (Trametes) versicolor nachgewiesen werden. Auch dieses Enzym benötigt den Zusatz von ATP, NADPH, $MgCl_2$ und R-SH. Das Enzym ist im Gegensatz zu dem induzierbaren Enzym aus Neurospora crassa konstitutiver Art.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

ADAM, H.: Adenosin-5'-diphosphat und Adenosin-5'-monophosphat. In: Methoden der enzymatischen Analyse, Hrsg. H.U.BERGMEYER, S. 573-577, Verlag Chemie, Weinheim 1962.

ANDREWS, P.: Estimation of molecular weights of proteins by sephadex gel-filtration. Biochem.J. 91, 222-233 (1964).

ARMSTRONG, M.D., K.N.F. SHAW und P.E. WALL: The phenolic acids of human urine. Paper chromatography of phenolic acids. J.biol.Chem. 218, 293-3o3 (1965).

AVISON, A.W.D.: The synthesis of acyl phosphates in aqueous solution. J.Chem.Soc. 1955, 732-738.

BACHMANN, D.M., B. DRAGOON und S. JOHN: Reduction of salicylate to saligenin by Neurospora. Arch.Biochem.Biophysics 91, 326 (196o).

BEADLE, G.W. und E.L. TATUM: Neurospora. II. Methods of producing and detecting mutations concerned with nutritional requirements. Am.J.Botany 32, 678-686 (1945).

BEISENHERZ, G., W.J. BOLTZE, TH. BÜCHER, R. CZOK, K.H. GARBADE, E. MEYER-ARENDT und G. PFLEIDERER: Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. Z.Naturforsch.8b, 555-557 (1953).

BENTLEY, R.: Preparation and analysis of kojic acid. In: Methods in Enzymology 3, Hrsg. S.P. COLOWICK und N.O. KAPLAN, S. 238-241, Academic Press, New York 1957.

BERG, P.: Assay and preparation of yeast aceto-CoA-kinase. In: Methods in Enzymology 5, Hrsg. S.P. COLOWICK und N.O. KAPLAN, S. 461-466, Academic Press, New York 1962.

BILLEK, G. und H. KINDL: Die pflanzlichen Stilbene. Österr. Chemiker-Ztg. 63, 273-281 (1962).

BIRCH, A.J. und F.W. DONOVAN: Studies in relation to biosynthesis I. Some possible routes to derivatives of orcinol and phloroglucinol. Austral.J.Chem. 6, 36o-368 (1953).

BJÖRKMAN, A.: Isolation of lignin from finely divided wood with neutral solvents. Nature (London) 174, 1o57-1o58 (1954).

BLACK, S. und N.G. WRIGHT: Aspartic ß-semialdehyde dehydrogenase and aspartic ß-semialdehyde. J.biol.Chem. 213, 39-5o (1955).

BRADFORD, S.W. und B.I. GIBGOT: Rapid production of neurospora hyphae. Neurospora Newsletter 4, 17-19 (1963).

BRAY, H.G., W.V. THORPE und K. WHITE: The fate of certain organic acids and amides in the rabbit. 1o. The application of paper chromatography to metabolic studies of hydroxybenzoic acids and amides. Biochem.J. 46, 271-278 (195o).

BRENNERMANN, F.N. und W.A. VOLK: Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase activity with triphosphopyridine nucleotide and with disphosphopyridine nucleotide. J.biol.Chem.234, 2443-2447 (1959).

BROWN, S.A. und A.C. NEISH: Studies of lignin biosynthesis using isotopic carbon. IV. Formation from some aromatic monomeres. Can.J.Biochem.Physiol. 33, 948-962 (1955).

BROWN, S.A.: Lignins. Ann.Rev.Plant Physiol. 17, 223-244 (1966).

BRUNNER, R., M. RÖHR und M. ZINNER: Zur Biosynthese des Penicillins. Untersuchungen zur enzymatischen Aktivierung von Phenylessigsäure und Phenoxyessigsäure sowie zur Bildung von Penicillin aus 6-Amino-Penicillansäure und aktivierter Seitenkettensäure durch Mycelhomogenate und zellfreie Extrakte von Penicillium chrysogenum. Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 349, 95-1o3 (1968).

BUCHER, N.L.R., P. OVERATH und F. LYNEN: ß-Hydroxy-ß-methylglutaryl Coenzyme A reductase, clevage and condensing enzymes in relation to cholesterol formation in rat liver. Biochim.Biophys.Acta (Amsterdam) 4o, 491-5o1 (196o).

BUCK, J.S.: Veratrum aldehyde. In: Organic Syntheses, Coll. Vol.2, Hrsg. A.H. BLATT, S. 619-621, Wiley and Sons, New York 1959.

BURTON, R.M. und E.R. STADTMAN: The oxidation of acetaldehyde to acetyl coenzyme A. J.biol.Chem.2o2, 873-89o (1953).

CAPUTTO, R. und M. DIXON: Crystallisation and identity of the triose and triosephosphate dehydrogenases of muscle. Nature (London) 156, 63o-631 (1945).

CHILSON, O.P., G.B. KITTO, J. PUDLES und N.O. KAPLAN: Reversible inactivation of dehydrogenases. J.biol.Chem. 241, 2431-2445 (1966).

CLELAND, W.W.: Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. Biochemistry (Washington) 3, 48o-482 (1964).

COHEN, G.N. und J. MONOD: Bacterial permease. Bact.Review 21, 169-194 (1957).

CORI, G.T., M.W. SLEIN und C.F. CORI: Crystalline D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from rabbit muscle. J.biol.Chem. 173, 6o5-618 (1948).

CRAWHALL, J.C. und S.SEGAL: Dithiothreitol in the study of cysteine transport. Biochim.Biophys.Acta (Amsterdam) 121, 215-217 (1966).

DETERMANN, H.: Stofftrennung durch Chromatographie an porösen Gelen. Angew.Chem. 76, 635-644 (1964).

EGGERER, H. und F. LYNEN: Zur Biosynthese der Fettsäuren. II. Synthese und Eigenschaften von S-Malonyl-Coenzym A. Biochem.Z. 335, 54o-547 (1962).

El-BASYOUNI, S.Z. und G.H.N. TOWERS: The phenolic acids in wheat. I. Changes during growth and development. Can.J.Biochem. 42, 2o3-21o (1964).

El-BASYOUNI, S.Z., A.C. NEISH und G.H.N. TOWERS: The phenolic acids in wheat. III. Insoluble derivatives of phenolic cinnamic acids as natural intermediates in lignin biosynthesis. Phytochem. 3, 627-639 (1964).

El-BASYOUNI, S.Z. und A.C. NEISH: Occurrence of metabolically-active bound forms of cinnamic acids and its phenolic derivatives in acetone powders of wheat and barley plants. Phytochem. 5, 683-691 (1966).

FARMER, V.C., M.E. HENDERSON und J.D. RUSSEL: Reduction of certain aromatic acids to aldehydes and alcohols by Polystictus versicolor. Biochim.Biophys.Acta (Amsterdam) 35, 2o2-211 (1959).

FISKE, C.H. und Y. SUBBAROW: The colorimetric determination of phosphorus. J.biol.Chem. 66, 375-4oo (1925).

FLORKIN, M. und E.H. STOTZ: Report of the commission on enzymes of the international union of biochemistry. In: Comprehensive Biochemistry 13, Elsevier Publishing Co., Amsterdam-London-New York 1965.

FREUDENBERG, K.: Biogenesis and constitution of lignin. Pure and Applied Chemistry 5, 9-2o (1962).

FREUDENBERG, K., C.L. CHEN und G. CARDINALE: Die Oxydation des methylierten und künstlichen Lignins. Chem.Ber. 95, 2814-2828 (1962).

FREUDENBERG, K.: Neuere Beiträge zur Bildung und Konstitution des Lignins. Brennstoffchemie 11, 328-331 (1963).

FREUDENBERG, K.: The formation of lignin in tissue and in vitro. In: Formation of Wood in Forest Trees, Hrsg. M.H. ZIMMERMANN, S. 2o3-218, Academic Press, New York 1964.

FROST, L.C.: Conidiating media for Neurospora. Neurospora Newsletter 1, 11 (1962).

GRISEBACH, H.: Biosynthesis of flavonoids. In: Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, Hrsg. T.W. GOODWIN, S. 279-3o8. Academic Press, London-New York 1965.

GRISEBACH, H., W. BARZ, K. HAHLBROCK, S. KELLNER und L. PATSCHKE: Recent investigations on the biosynthesis of flavonoids. In: Biosynthesis of Aromatic Compounds, Proceedings of the 2nd Meeting of the Federation of European Biochemical Societies, Vol. 3, Hrsg. G. BILLEK, S. 25-36, Pergamon Press, Oxford 1966.

HAHLBROCK, K.: Zur Biosynthese der Flavonoide. Untersuchungen über die Aktivierung von Carbonsäuren und die Kondensation von CoA-Estern in zellfreien Pflanzenextrakten. Dissertation, Freiburg 1965.

HANES, C.S. und F.A. ISHERWOOD: Separation of the phosphoric esters on the filter paper chromatogramm. Nature (London) 164, 11o7-1112 (1949).

HAUSER, C.R. und W.B. RENFROW: Benzohydroxamic acid. In: Organic Syntheses, Coll. Vol. 2, Hrsg. A.H.BLATT, S. 67-68, Wiley and Sons, New York 1959.

HENDERSON, M.E.K.: Release of aromatic compounds from birch and spruce sawdusts during decomposition by white-rot fungi. Nature (London) 175, 634-635 (1955).

HENDERSON, M.E.K.: Metabolism of methoxylated aromatic compounds by soil fungi. J.gen.Microbiol.16, 686-695 (1957).

HIGUCHI, T.: Studies of lignin biosynthesis using isotopic carbon. X. Formation of lignin from phenylpropanoids in tissue culture of white pine. Can.J.Biochem.Physiol. 4o, 31-34 (1962).

HIGUCHI, T. und S.A. BROWN: Studies of lignin biosynthesis using isotopic carbon. XIII. The phenylpropanoid system in lignification. Can.J.Biochem.Physiol. 41, 621-628 (1963).

HOOD, W. und N.G. CARR: A single glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase active with NAD and NADP in Anabaena variabilis. Biochim.Biophys.Acta (Amsterdam) 146, 3o9-311 (1967).

HURST, H.M., A. BURGES and P. LATTER: Some aspects of the biochemistry of humic acid decomposition by fungi. Phytochem. 1, 227-231 (1962).

HURST, H.M.: Aromatic acid reducing systems in fungi. In: Enzyme chemistry of phenolic compounds. Proceedings of the plant phenolics group symposium Liverpool 1962, Hrsg. J.B. PRIDHAM, S. 121-128, Pergamon Press, Oxford 1963.

ISHIKAWA, H., W.J. SCHUBERT und F.F. NORD: Investigations on lignins and lignification. XXVII. The enzymic degradation of softwood lignin by white-rot fungi. Arch. Biochem.Biophysics 1oo, 131-139 (1963a).

ISHIKAWA, H., W.J. SCHUBERT und F.F. NORD: Investigations on lignins and lignification. XXVIII. The degradation by Polyporus versicolor and Fomes fomentarius of aromatic compounds structurally related to softwood lignin. Arch.Biochem.Biophysics 1oo, 14o-149 (1963b).

KATAGIRI, M., S. TAKEMORI, K. NAKAZAWA, H. SUZUKI und K. AKAGI: Benzylalcohol dehydrogenase, a new alcohol dehydrogenase from Pseudomonas sp. Biochim.Biophys. Acta (Amsterdam) 139, 173-176 (1967).

KEILIN, D. und E.F. HARTREE: On the mechanism of the decomposition of hydrogen peroxide by catalase. Proc.Roy. Soc.London B, 124, 397-4o5 (1938).

KENNEDY, E.P. und G.A. SCARBOROUGH: Mechanism of hydrolysis of o-nitrophenyl-ß-galactoside in Staphylococcus aureus and its significance for theories of sugar transport. Proc.Nat.Acad.Sci. 58, 225-228 (1967).

KLINGMÜLLER, W.: Aktive Aufnahme von Zuckern durch Zellen von Neurospora crassa unter Beteiligung eines enzymatischen Systems mit Permease-Eigenschaften II. Z.Naturforsch. 22b, 188-195 (1967a).

KLINGMÜLLER, W.: Die Aufnahme der Zucker Sorbose, Fructose und Glucose durch Sorbose-resistente Mutanten von Neurospora crassa. Z.Naturforsch. 22b, 327-335 (1967b).

KOUKOL, J. und E.E. CONN: Purification and properties of the phenylalanine deaminase of Hordeum vulgare. J.biol.Chem. 236, 2692-2698 (1961).

KREBS, H.A. und R. HEMS: Some reactions of adenosine and inosine phosphates in animal tissues. Biochim. Biophys.Acta (Amsterdam) 12, 172-18o (1953).

LANE, R.D., K.L. ROMINGER, D.L. YOUNG und F. LYNEN: The enzymatic synthesis of holotranscarboxylase from apotranscarboxylase and (+) Biotin. J.biol.Chem. 239, 2865-2871 (1964).

LINEWEAVER, H. und D. BURK: The determination of enzyme dissociation constants. J.Amer.chem.Soc. 56, 658-666 (1934).

LINN, T.C.: The demonstration and solubilization of ß-hydroxy-ß-methylglutaryl coenzyme A reductase from rat liver microsomes. J.biol.Chem. 242, 984-989 (1967).

LIPMANN, F. und L. TUTTLE: A specific micromethod for the determination of acyl phosphates. J.biol.Chem. 159, 21-28 (1945).

LOWRY, H.O., N.J. ROSEBROUGH, H.L. FARR und R.J. RANDALL: Protein measurement with the folin phenol reagent. J.biol.Chem. 193, 265-275 (1951).

LYNEN, F. und TADA, M.: Die biochemischen Grundlagen der "Polyacetat-Regel". Angew.Chem. 73, 513-519 (1961).

MAHLER, H.R., S.J. WAKIL und R.M. BOCK: Studies on fatty acid oxidation I. Enzymatic activation of fatty acids. J.biol.Chem. 2o4, 453-468 (1953).

MALMSTRÖM, G., G. FÄHRAEUS und R. MOSBACH: Purification of laccase. Biochim.Biophys.Acta (Amsterdam) 28, 652-53 (1958).

MARSHALL, F.D. und O.J. KOEPPE: Enzymatic biosynthesis of benzoylornithines. Biochemistry (Washington) 3, 1692-1695 (1964).

MAURER, H.R.: Disk-Elektrophorese. Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Walter de Gruyter und Co., Berlin 1968.

McCALLA, D.R. und A.C. NEISH: Metabolism of phenylpropanoid compounds in Salvia. II. Biosynthesis of phenolic cinnamic acids. Can.J.Biochem.Physiol. 37, 537-547 (1959).

MICHAL, G. und H.U. BERGMEYER: Coenzym A. In: Methoden der enzymatischen Analyse, Hrsg. H.U. BERGMEYER, S. 512-527, Verlag Chemie, Weinheim 1962.

MICHELSON, A.M.: Synthesis of Coenzym A. Biochim.Biophys.Acta (Amsterdam) 93, 71-77 (1964).

MOSBACH, K.: Pers. Mitteilung (1967).

NAKAMURA, W. und Y. NOZU: Studies on the biosynthesis of lignin II. Purification and properties of peroxidases from bamboo shoot. J.Biochemistry (Tokyo) 62, 3o8-314 (1967).

NEISH, A.C.: Biosynthetic pathways of aromatic compounds. Ann.Rev.Plant Physiol. 11, 55-8o (196o).

NEISH, A.C.: Formation of m- and p-coumaric acids by enzymatic deamination of the corresponding isomers of tyrosine. Phytochem. 1, 1-24 (1961).

NEISH, A.C.: Cinnamic acid derivatives as intermediates in the biosynthesis of lignin and related compounds. In: The formation of Wood in Forest Trees, Hrsg. M.H. ZIMMERMANN, S. 219-239, Academic Press, New York-London 1964.

QUAYLE, J.R.: Glyoxalate dehydrogenase. In: Methods in Enzymology 9, Hrsg. W.A. WOOD, S. 342-346, Academic Press, New York 1966.

RAMAN, T.S. und E.R.B. SHANMUGASUNDARAM: Metabolism of some aromatic acids by Aspergillus niger. J.Bacteriol. 84, 1339-134o (1962).

RANDERATH, K.: Dünnschicht-Chromatographie, Verlag Chemie, Weinheim 1962.

REZNIK, H.: Vergleichende Biochemie der Phenylpropane. Ergeb. Biol. 23, 14-46 (196o).

ROSSI, C.R. und D.M. GIBSON: Activation of fatty acids by a guanosine triphosphate specific thiokinase from liver mitochondria. J.biol.Chem. 239, 1694-1699 (1964).

SCHACHTER, D. und J.V. TAGGART: Benzoyl-CoA and hippurate synthesis. J.biol.Chem. 2o3, 925-934 (1953).

SCHACHTER, D. und J.V. TAGGART: Glycine N-acylase: Purification and properties. J.biol.Chem. 2o8, 263-275 (1954).

SCHAEFLER, S. und J. SCHENKEIN: ß-Glucoside permeases and phospho ß-glucosidases in Aerobacter aerogenes: Relationship with cryptic phospho ß-glucosidases in enterobacteriae. Proc.Nat.Acad.Sci. 59, 285-292 (1968).

SCHUBERT, W.J.: Lignin Biochemistry. Academic Press, New York-London 1965.

SEUBERT, W.: Äthylenhydrase. Dissertation, München 1955.

SHRINER, R.L., R.C. FUSON und D.Y. CURTIN: The systematic identification of organic compounds. Wiley and Sons, New York, Chapman and Hall, London 1959.

SLOANE, N.H., K.G. UNTCH und A.W. JOHNSON: Metabolites of p-aminobenzoic acid. III. A metabolic pathway of p-aminobenzoic acid resulting in the sequential formation of p-aminobenzylalcohol and p-hydroxy-aniline. Biochim.Biophys.Acta (Amsterdam) 78, 588-593 (1963).

SNYDER, H.R. und F.J. PILGRIM: The preparation of 3-indole-acetic acid; a new synthesis of tryptophol. J.Amer.chem.Soc. 7o, 377o-3771 (1948).

STADTMAN, E.R.: Preparation and assay of acyl coenzyme A and other thiol esters. In: Methods in Enzymology 3, Hrsg. S.P. COLOWICK und N.O. KAPLAN, S. 931-941, Academic Press, New York 1957.

SURDIN, Y.: La semi-aldehyde aspartique deshydrogenase chez Saccharomyces cerevisiae: proprietes et regulation. European J.Biochem. 2, 341-348 (1967).

THORN, W., G. PFLEIDERER, R.A. FROWEIN und I. ROSS: Stoffwechselvorgänge im Gehirn bei akuter Anoxie, akuter Ischämie und in der Erholung. Pflügers Arch.ges. Physiol. 261, 334-36o (1955).

VOLLMER, K.O., H.J. REISENER und H. GRISEBACH: The formation of acetic acid from p-hydroxycinnamic acid during its degradation to p-hydroxybenzoic acid in wheat shoots. Biochem.Biophys.Res.Comm. 21, 221-225 (1965).

WARBURG, O. und W. CHRISTIAN: Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. Biochem.Z. 31o, 384-421 (1942).

WEISS, F.A.: Maintenance and preservation of cultures. In: Manual of microbiological methods, S. 99-119. McGraw-Hill Book Comp., New York-Toronto-London 1957.

WENZEL, M. und P.E. SCHULZE; Tritiummarkierung. Walter de Gruyter und Co., Berlin 1962.

WHEATON, T.A. und I. STEWART: Feruloylputrescine: Isolation and identification from citrus leaves and fruit. Nature (London) 206, 62o-621 (1965).

ZENK, M.H.: Enzymatische Aktivierung von Auxinen und ihre Konjugierung mit Glyzin. Z.Naturforsch. 15b, 436-441 (196o).

ZENK, M.H.: Biosynthese von Vanillin in Vanilla planifolia Andr. Z.Pflanzenphysiol. 53, 4o4-414 (1965).

ZENK, M.H.: Biosynthesis of C_6-C_1-compounds. In: Biosynthesis of Aromatic Compounds, Proceedings of the 2nd Meeting of the Federation of European Biochemical Societies, Vol. 3, Hrsg. G. BILLEK, S. 45-6o, Pergamon Press, Oxford 1966.

ZENK, M.H.: Pathways of salicyl alcohol and salicin formation in Salix purpurea L. Phytochem. 6, 245-252 (1967).

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr.M.H. Zenk durchgeführt. Für die Überlassung des Themas, die vielseitigen Anregungen und die ständige Anteilnahme an allen wissenschaftlichen und persönlichen Fragen sei an dieser Stelle herzlich gedankt.

Herrn Professor Dr.L. Brauner gilt mein Dank für sein freundliches Interesse am Fortgang der Arbeit und für die Erteilung der Verwaltung einer wissenschaftlichen Assistentenstelle an seinem Institut.

Herrn Privatdozent Dr.W. Kau bin ich für seine steten Bemühungen und seine Anteilnahme auch an persönlichen Fragen zu Dank verpflichtet.

Herrn Dr. A. Böck möchte ich für vielfältige fruchtbare Diskussionen und für zahlreiche praktische Hinweise meinen besonderen Dank aussprechen.

Die Arbeit wurde durch Sachbeihilfen der Deutschen Forschungsgemeinschaft an Herrn Prof.Dr.Zenk unterstützt.

L e b e n s l a u f

Am 26. Juli 1941 wurde ich, Georg Günter Groß, als Sohn des damaligen Studienassessors und jetzigen Oberstudienrats Josef Groß und seiner Ehefrau Elisabeth, geborene Westermeier, in Augsburg geboren.

Von 1947 bis 1949 besuchte ich die Volksschule in Freising, von 1950 bis 1951 die Seminarübungsschule in Straubing. 1951 trat ich in die dortige Oberrealschule ein, die ich bis 1956 besuchte. Von 1956 bis 1960 besuchte ich in Freising das Domgymnasium mit Oberrealschule und legte 1960 an dieser Schule die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1960/61 begann ich an der Universität München mit dem Studium der Fächer Biologie, Chemie und Erdkunde, das ich in den Jahren 1965 und 1966 mit der wissenschaftlichen Prüfung für das Lehramt an Gymnasien beendete.

Mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit begann ich im Jahre 1964 im Botanischen Institut der Universität München unter der Leitung von Herrn Prof.Dr.M.H.Zenk. Am gleichen Institut war ich in den Jahren 1965 und 1966 als wissenschaftliche Hilfskraft angestellt; seit 1966 habe ich die Verwaltung einer wissenschaftlichen Assistentenstelle inne. Seit 1967 bin ich verheiratet.